

**Herstellung und Charakterisierung von
Siliconölemulsionen sowie Untersuchungen
zu ihrem therapeutischen Potenzial bei
chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Apothekerin Katja Presselt
geboren am 16.04.1981 in Arnstadt

Jena 2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. Götz Nowak
2. Prof. Dr. Heike Bunjes
3. Prof. Dr. Christel Müller-Goymann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 2.09.2010

Für
Martin und Friedrich

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Motivation, Problemstellung und Ziel der Arbeit</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>Allgemeiner Teil</u>	<u>3</u>
2.1	Emulsionen	3
2.1.1	Allgemeines	3
2.1.2	Herstellung von Emulsionen	3
2.1.3	Stabilität von Emulsionen	4
2.2	Siliconöle	6
2.2.1	Chemische Struktur und Eigenschaften	6
2.2.2	Industrielle Anwendung	8
2.2.3	Dimeticon und Simeticon	8
2.2.4	Toxizität	9
2.2.5	Siliconölemulsionen	10
2.2.6	Medizinische Anwendung	11
2.3	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	15
2.3.1	Pathogenese	15
2.3.2	Klinik und Diagnose	18
2.3.3	Therapie	19
2.3.4	Experimentell induzierte Colitis im Tiermodell	21
2.3.4.1	DSS-Colitis	21
2.3.4.2	TNBS-Colitis	22
<u>3</u>	<u>Material und Methoden</u>	<u>23</u>
3.1	Material	23
3.1.1	Ölkomponenten der dispersen Phase	23
3.1.2	Emulgatoren	24
3.1.3	Verwendete Mikroorganismen	28
3.1.4	Nährmedien und Lösungen für die mikrobiologischen Untersuchungen	28
3.1.5	Phosphatpuffer und weitere Lösungen	30
3.1.6	Weitere Stoffe	31
3.2	Herstellungsmethoden für die Emulsionen und Lipidnanopartikel	32
3.2.1	Hochdruckhomogenisation	32
3.2.2	Autoklavieren der Emulsionen	32

3.3	Physikochemische Methoden	33
3.3.1	Teilchengrößenanalyse	33
3.3.1.1	<i>Laserdiffraktometrie mit PIDS-Technologie</i>	33
3.3.1.2	<i>Single Particle Optical Sensing (SPOS)</i>	33
3.3.1.3	<i>Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)</i>	34
3.3.2	Bestimmung des Zetapotenzials	35
3.3.3	pH-Wert-Bestimmung	35
3.3.4	Bestimmung der Osmolalität	35
3.3.5	Bestimmung des Cloud Points (Trübungspunkt)	36
3.3.6	Bestimmung der Oberflächenspannung und des Kontaktwinkels	36
3.3.6.1	<i>Oberflächenspannung</i>	36
3.3.6.2	<i>Kontaktwinkel</i>	36
3.3.6.3	<i>Statistische Auswertung</i>	38
3.3.7	Kapillarviskosimetrie	39
3.3.8	Dichtebestimmung	39
3.3.9	Mikro-Raman-Spektroskopie	40
3.3.10	Dünnschichtchromatographie	40
3.4	Mikrobiologische Methoden	42
3.4.1	Anzucht der Testorganismen und Herstellung des Inokulums	42
3.4.2	Beimpfung der Proben und Bestimmung der Keimzahlreduktion	43
3.4.2.1	<i>Prüfung auf ausreichende Konservierung</i>	43
3.4.2.2	<i>Aufbauende Studien zur antibakteriellen Aktivität</i>	44
3.4.3	Beurteilung der antimikrobiellen Aktivität	44
3.5	Tierexperimentelle Methoden	46
3.5.1	Versuchstiere	46
3.5.2	DSS-induzierte Colitis	46
3.5.2.1	<i>Versuchsgruppen</i>	46
3.5.3	TNBS-induzierte Colitis	47
3.5.3.1	<i>Versuchsgruppen</i>	47
3.5.4	Versuchsende und Sektion	47
4	<u>Ergebnisse und Diskussion</u>	50
4.1	Herstellung und Charakterisierung der Emulsionen	50
4.1.1	Einfluss der Prozessparameter	50
4.1.1.1	<i>Homogenisationsdruck</i>	50
4.1.1.2	<i>Zyklenanzahl</i>	52
4.1.1.3	<i>Wahl der Standardprozessparameter</i>	52
4.1.2	Einfluss weiterer Parameter auf die Partikelgröße der Siliconölemulsionen	53

4.1.2.1	Viskosität der Siliconöle	53
4.1.2.2	Emulgatoreinfluss auf die Partikelgröße von M10- und M500-Siliconölemulsionen	54
4.1.2.3	Einfluss des Autoklavierprozesses auf die Partikelgröße der M10- und M500-Siliconölemulsionen	58
4.1.2.4	Einfluss der Emulgatorkonzentration	67
4.1.3	Lagerungsstabilität	69
4.1.4	Stabilität der M500-Siliconölemulsionen in künstlichem Magensaft	73
4.1.4.1	Vergleich der M500-Siliconölemulsionen	74
4.1.4.2	Instabilität der S570-Siliconölemulsion	76
4.1.5	Kommerzielle Siliconölemulsionen	80
4.1.5.1	Zusammensetzung und Partikelgröße kommerzieller Siliconölemulsionen	80
4.1.5.2	Stabilität der kommerziellen Emulsionen im künstlichen Magensaft	81
4.2	Einfluss der Viskosität der äußeren Phase auf die Partikelgröße von Siliconölemulsionen und Nanopartikeln	83
4.2.1	Siliconölemulsionen	83
4.2.2	Nanopartikel	88
4.2.3	Zusammenfassung	89
4.3	Untersuchungen zum Ausbreitungsverhalten ausgewählter Siliconölemulsionen	90
4.3.1	Emulgatoreinfluss	90
4.3.2	Einfluss der Ölkomponente	93
4.3.3	Einfluss der Siliconölkonzentration	95
4.3.4	Einfluss der Partikelgröße	96
4.3.5	Zusammenfassung	98
4.4	Mikrobiologische Untersuchungen	100
4.4.1	Prüfung auf ausreichende Konservierung	100
4.4.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	101
4.4.1.2	<i>Candida albicans</i> und <i>Aspergillus niger</i>	104
4.4.1.3	Zusammenfassung	106
4.4.2	Mikrobiologische Untersuchungen mit <i>E. coli</i> 2332	107
4.4.2.1	Einfluss von pH-Wert und Osmolalität der äußeren Phase der Emulsion	108
4.4.2.2	Einfluss des Emulgators und der Ölkomponente	112
4.4.2.3	Einfluss der Siliconölkonzentration sowie der Inokulationskonzentration	117
4.4.2.4	Einfluss der Partikelgröße	120
4.4.2.5	Zusammenfassung	122
4.5	Tierexperimentelle Studien	123
4.5.1	DSS-induzierte Colitis	123
4.5.2	TNBS-induzierte Colitis	129

4.5.3	Zusammenfassung	134
<u>5</u>	<u>Abschlussdiskussion</u>	<u>135</u>
<u>6</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>143</u>
<u>7</u>	<u>Summary</u>	<u>146</u>
<u>8</u>	<u>Literatur</u>	<u>148</u>
<u>A</u>	<u>Anhang</u>	<u>167</u>
A1	Autoklavier- und Lagerstabilität der Emulsionen	167
A2	Zusammensetzung der kommerziellen Emulsionen	170
A3	Untersuchungen zum Ausbreitungsverhalten - Partikelgröße der Emulsionen	171
A4	Ergänzende mikrobiologische Untersuchungen mit <i>S. aureus</i> und <i>P. aeruginosa</i>	171
A5	Untersuchungen mit <i>E. coli</i> 2332 – Median-Werte der Emulsionen	173
A6	DSS-induzierte Colitis im Mausmodell – Versuch 3	173
A7	TNBS-induzierte Colitis im Mausmodell – Versuch 1	174
	<u>Danksagung</u>	<u>175</u>
	<u>Selbstständigkeitserklärung</u>	<u>176</u>
	<u>Lebenslauf</u>	<u>177</u>

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ATCC	American Type Culture Collection
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAC	kritische Aggregationskonzentration
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
CU	Colitis ulcerosa
D100, D _{max}	Alle Teilchen der inneren Phase sind kleiner oder gleich dem D100-Wert. → größte gemessene Partikel
D50	50% der Teilchen sind größer und die anderen 50% der Teilchen sind kleiner als der D50-Wert; teilt eine Verteilung in zwei gleich große Teile; auch als Median bezeichnet
D99	99% der Teilchen der inneren Phase sind kleiner oder gleich dem D99-Wert.
DC	Dünnschichtchromatographie
DLVO-Theorie	Theorie benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DSS	Natrium-Dextransulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G-	Gramnegatives Bakterium
G+	Grampositives Bakterium
GALT	gut associated lymphoid tissue
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
INF	Interferon
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LAF	Laminar Air Flow
LD	Laserdiffraktometrie
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharid
max.	maximal

MC	Morbus Crohn
min.	minimal
MS	Künstlicher Magensaft (ohne Pepsin)
MSL	Magenschlauch
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
nA	nach dem Autoklavieren
NF- κ B	Transkriptionsfaktor (kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells)
O/W	Öl in Wasser
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PEG	Polyethylenglycol (Polyoxyethylen)
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PI	Polydispersitätsindex
PIDS	Polarization Intensity Differential Scattering
PPG	Polypropylenglycol (Polyoxypropylen)
PT	Phasentrennung
PW	Pilzwachstum
R _f	Retentionsfaktor
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.c.	subkutan
SLP	Surfactant Lipid Preparation
SPOS	Single Particle Optical Sensing
spp.	species pluralis
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
USP	United States Pharmacopeia
vA	vor dem Autoklavieren
W	Wochen
W/O	Wasser in Öl
Z	Zyklus, z.B. Z6 → 6. Zyklus

1 Motivation, Problemstellung und Ziel der Arbeit

Siliconöle sind oberflächenaktive und chemisch inerte Substanzen, die in vielen Gebieten der Industrie Anwendung finden (1). Aber auch therapeutisch sind Siliconöle (Dimeticon/Simeticon) von großer Bedeutung. Sie werden in verschiedenen Bereichen der Medizin eingesetzt, insbesondere in der Gastroenterologie zur Beseitigung von störenden Gasansammlungen im Magen-Darm-Trakt (2).

Aufgrund der hohen Oberflächenaktivität der Siliconöle können diese potenziell auch andere oberflächenabhängige Prozesse im menschlichen Organismus wie die Anheftung und Ausbreitung von pathogenen Bakterien an Zelloberflächen beeinflussen. Birtley et al. konnten bereits 1973 zeigen, dass Dimeticon und Simeticon einen protektiven Film auf der Darmmukosa bilden, und auch Bergmann et al. beschrieben einen Schutz der Magen- und Darmmukosa nach oraler Dimeticon-Applikation (3,4). Außerdem konnte eine verminderte Adsorption von Bakterien an Siliconöl-behandelten Oberflächen (5,6) sowie eine antimikrobielle Aktivität von reinem Siliconöl anhand verschiedener Mikroorganismen (7-9) nachgewiesen werden.

Die Motivation für diese Arbeit war der Gedanke, Siliconöle aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften auch zur Therapie von anderen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Morbus Crohn (MC) oder Colitis ulcerosa (CU) einzusetzen. In der Pathogenese der CED wird unter anderem eine gestörte intestinale Barriere mit einer gesteigerten Permeabilität sowie eine veränderte Mikroflora mit einem erhöhten Anteil an pathogenen Bakterien diskutiert (10-12). Da infolge der oralen Siliconölapplikation bereits die Bildung eines Schutzfilmes auf der Darmmukosa beschrieben wurde (3,4), könnte durch die Gabe von Siliconölen die Permeabilität der intestinalen Barriere insbesondere für pathogene Keime und deren Lipopolysaccharide verringert werden. Auch eine mögliche antimikrobielle Wirkung der Siliconöle wäre vermutlich von Vorteil in der Behandlung der CED. Der erfolgreiche Einsatz von Probiotika und Antibiotika in der Therapie von CU und MC weist bereits darauf hin, dass eine Stärkung der intestinalen Barriere sowie eine Reduktion der Zahl pathogener Keime von Vorteil für den Verlauf der Krankheit ist (13-15).

Die standardmäßige Therapie der akuten Entzündungsreaktion erfolgt zum heutigen Zeitpunkt mit verschiedenen Antiphlogistika und Immunsuppressiva, die jedoch zum Teil starke Nebenwirkungen besitzen (16,17). Siliconöle hätten diesen Medikamenten gegenüber den Vorteil, dass sie nach oraler Gabe nahezu nicht resorbiert und unverändert ausgeschieden werden (18). Sie besitzen keine akute orale Toxizität und weisen in der Regel keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf (19).

Da für den angestrebten Therapieansatz die orale Applikation des reinen Öls eine schlechte Compliance der Patienten bedingen würde, war ein erstes Ziel dieser Arbeit, geeignete Siliconöle als O/W-Emulsionen mittels Hochdruckhomogenisation zu formulieren. Dazu wurden unterschiedlich viskose Siliconöle (Dimeticone) sowie verschiedene Emulgatoren eingesetzt. Die Siliconölemulsionen sollten eine gute Autoklavier- und Lagerstabilität aufweisen und im Hinblick auf die orale Applikation eine angemessene Stabilität im künstlichen Magensaft besitzen.

Neben der Formulierung der Emulsionen und der Beurteilung ihrer Stabilität sollten die Siliconölemulsionen insbesondere hinsichtlich ihres therapeutischen Potenzials bei CED untersucht werden. Da der Filmbildungseffekt von Siliconölen (3,20) von therapeutischem Nutzen sein könnte, sollten Siliconölemulsionen selektiert werden, die ein besonders gutes Ausbreitungs- und Benetzungsverhalten aufweisen. Dieses wurde durch die Oberflächenspannungen sowie die Kontaktwinkel der unterschiedlichen Siliconölemulsionen charakterisiert.

Da bei Patienten mit CED eine Zunahme des Anteils von pathogenen Bakterien beobachtet werden kann (10-12), war auch die antimikrobielle Aktivität der formulierten Siliconölemulsionen von Interesse. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob der in der Literatur beschriebene antimikrobielle Effekt des reinen Siliconöls auch im Zweiphasensystem erhalten bleibt (7,8). Außerdem sollte in mikrobiologischen Studien an *E. coli* 2332 eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Zubereitungen erfolgen sowie der Einfluss verschiedener Parameter (z.B. Emulgator, Siliconölviskosität und -konzentration) beurteilt werden.

Abschließend sollte geprüft werden, ob eine Korrelation zwischen den gewonnen in-vitro-Ergebnissen und tierexperimentellen Studien besteht. Das therapeutische Potenzial von bestimmten Siliconölemulsionen wurde dazu in zwei experimentellen Colitis-Modellen (DSS- bzw. der TNBS-induzierten Colitis in C57BL/6-Mäusen) bewertet.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, ob und unter welchen Bedingungen Siliconöle in Form von Emulsionen ein therapeutisches Potenzial zur Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen besitzen. Für die mögliche Therapie sollten aufbauend auf den Ergebnissen der verschiedenen Studien schließlich eine oder mehrere stabile, gut wirksame Siliconölemulsionen ausgewählt werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Emulsionen

2.1.1 Allgemeines

Emulsionen sind disperse Mehrphasensysteme, die aus mindestens zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten bestehen (21). Laut der Definition der IUPAC sind in einer Emulsion flüssige Tröpfchen und/oder flüssige Kristalle (innere Phase) in einer Flüssigkeit (äußere, kontinuierliche Phase) dispergiert (22). Bei einer Öl-in-Wasser-Emulsion (O/W-Emulsion) ist die lipophile Phase in der hydrophilen Phase dispergiert (Abb. 2-1). Im umgekehrten Fall handelt es sich um eine Wasser-in-Öl-Emulsion (W/O-Emulsion). Aufgrund der unterschiedlichen Lichtbrechung der beiden Phasen des Systems erscheinen die Emulsionen milchig und trüb (23).

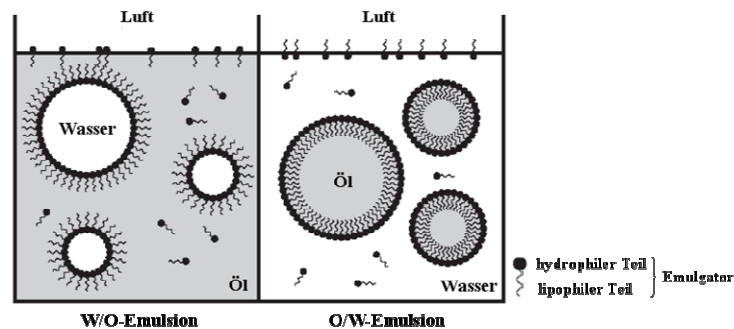


Abb. 2-1: Schematische Darstellung von W/O- und O/W-Emulsionen mit Emulgatormolekülen; Anordnung der Emulgatormoleküle erfolgt entsprechend des Emulsionstyps (24)

2.1.2 Herstellung von Emulsionen

Die beiden nicht miteinander mischbaren Phasen werden durch Energieeintrag dispergiert, wodurch die Grenzfläche zwischen beiden Phasen und damit die Grenzflächenenergie deutlich vergrößert wird. Emulsionen sind daher thermodynamisch instabile Mehrphasensysteme (21,23). Die für die Dispergierung notwendige mechanische Energie kann mit Hilfe verschiedener Dispergiermaschinen (z.B. Rührwerke, Ultraschallgeneratoren, Homogenisatoren, Kolloidmühlen) in das System eingebracht werden, die in der Literatur ausführlich beschrieben sind (25,26). Für die Herstellung von Emulsionen ist der Einsatz von Emulgatoren, grenzflächenaktiven Substanzen, von großer Bedeutung. Emulgatoren sind amphiphile Moleküle, die die Grenzflächenspannung herabsetzen und folglich die Stabilität der Emulsionen erhöhen (21). Sie können während der Herstellung der Emulsion in der äußeren Phase gelöst („englische Methode“) bzw. in der inneren Phase dispergiert („kontinentale Methode“) werden (27).

2.1.3 Stabilität von Emulsionen

An Emulsionen für pharmazeutische Anwendungen wird die Anforderung gestellt über einen bestimmten Zeitraum stabil zu sein und kein Partikelgrößenwachstum aufzuweisen. Für die Stabilisierung von Emulsionen gegen ein Teilchengrößenwachstum werden zwei wesentliche Stabilisierungsmechanismen, die elektrostatische und sterische Stabilisierung, diskutiert (21,26).

Eine elektrostatische Stabilisierung tritt bei dem Einsatz von ionogenen Emulgatoren (z.B. Natriumdodecylsulfat (SDS)) zur Emulsionsherstellung auf. Die Grenzfläche der Tröpfchen wird dabei infolge der Adsorption des Emulgators geladen. Die Oberflächenladungen werden mit zunehmendem Abstand von der Tröpfchenoberfläche allmählich durch Gegenionen kompensiert, die eine diffuse Ionenschicht um die Teilchen bilden. Die gleichsinnigen Ladungen der Teilchen limitieren ihre gegenseitige Annäherung durch eine elektrostatische Abstoßung und verhindern somit eine Koaleszenz der Teilchen. Der Einfluss der elektrostatischen Kräfte wird durch die DLVO-Theorie beschrieben (28). Das Zetapotenzial ζ , das elektrische Potenzial an der Scherebene um die Partikel, kann als Maß für das Abstoßungsverhalten von gleichgeladenen Partikeln einer Dispersion dienen.

Werden bei der Herstellung von Emulsionen niedermolekulare nichtionogene Emulgatoren (z.B. Cremophor® EL, Tween® 80) oder Blockcopolymere (z.B. Poloxamer 188) verwendet, sind hauptsächlich sterische Effekte für die Stabilisierung verantwortlich. Die ungeladenen Polymerketten der Emulgatoren, die an der Grenzfläche des Tröpfchens in das Dispersionsmedium ragen, durchdringen sich bei der Annäherung von zwei Emulsionstropfen. Dadurch wird die Beweglichkeit der Ketten eingeschränkt und die Entropie des Systems verringert. Die Tröpfchen haben nun das Bestreben wieder auseinander zu treiben, um den energetisch ungünstigen Zustand aufzuheben. Weiterhin liefert der osmotische Effekt einen Beitrag zur sterischen Stabilisierung. Das Annähern von zwei Tröpfchen führt zu einer erhöhten Konzentration von Polymersegmenten und folglich entsteht ein osmotischer Druck im Annäherungsbereich der Tröpfchen. Dies bewirkt die Diffusion von Wasser zwischen die Oberflächen und folglich werden die beiden Tröpfchen auseinander gedrückt (29,30). Zusätzlich kann bei Emulsionen, die mit nichtionischen Emulgatoren stabilisiert werden, auch eine negative Ladung der Tröpfchen auftreten. In der Literatur wird als Ursache die Adsorption von Hydroxid-Ionen an den Ethersauerstoff der PEG-Ketten der Emulgatoren diskutiert (spezifische Ionenadsorption) (31,32).

Wichtig für die Stabilität von Emulsionen ist auch die Viskoselastizität des Emulgatorfilms um das Tröpfchen. Der Emulgatorfilm muss fluide sein, um auftretende Verformungen auszugleichen, aber auch ausreichend rigide, um das Interagieren beim Zusammenstoß von zwei Tröpfchen zu verhindern und somit deren Koaleszenz vorzubeugen (23).

Eine weitere Möglichkeit der Emulsionsstabilisierung ist der Einsatz von partikulären Feststoffen (z.B. modifizierte Siliciumdioxidpartikel). Voraussetzung dafür ist ein amphiphiler Charakter der Feststoffe, um sowohl von der hydrophilen als auch von der lipophilen Phase benetzt zu werden. Die kolloidalen Feststoffpartikel legen sich in einer dicht gepackten Schicht um die Tropfen der dispersen Phase und verhindern so auf mechanischem Weg deren Koaleszenz (23,33).

Trotz der Stabilisierung von Emulsionen können Instabilitätsphänomene auftreten. Infolge eines Dichteunterschiedes zwischen der dispersen Phase und dem Dispersionsmittel kann es zur Aufräumung oder zur Sedimentation der Partikel kommen (23). Um diese Vorgänge zu unterbinden bzw. einzuschränken ist beispielsweise eine Verringerung der Partikelgröße oder der Zusatz von Verdickungsmitteln, so genannten Quasiemulgatoren (z.B. Gummi arabicum, Traganth) sinnvoll. Da die Quasiemulgatoren die Viskosität der äußeren Phase erhöhen, wird die Beweglichkeit der Tröpfchen stark eingeschränkt und folglich nimmt die Stabilität von Emulsionen zu (30). Häufig wirken diese Substanzen jedoch nicht nur als Verdickungsmittel, sondern weisen auch eine Grenzflächenaktivität auf (z.B. Hydroxypropylmethylcellulose) (34).

Sedimentation und Aufräumung sind reversible Prozesse, die durch eine eventuell auftretende Flockung (Bildung von redispergierbaren Agglomeraten) beschleunigt werden. Alle drei Instabilitätsphänomene führen zu einer lokalen Konzentrationserhöhung und verstärkten Annäherung der Tropfen. Dies begünstigt das irreversible Zusammenfließen der Partikel (Koaleszenz), das schließlich zur Phasentrennung führen kann (Brechen der Emulsion) (23,35).

Eine Emulsion gilt als kinetisch stabil, wenn sich ihr Dispersitätsgrad durch Beanspruchung wie z.B. Lagerung oder Wärme nicht deutlich ändert. Um die Stabilität von Emulsionen zu beurteilen werden häufig die Partikelgrößen der dispersen Systeme bestimmt. Dabei kommen verschiedenste Messprinzipien zum Einsatz (z.B. Laserdiffraktometrie, Photonenkorrelationsspektroskopie), die in der Literatur ausführlich beschrieben sind (36).

2.2 Siliconöle

Silicone werden heute in verschiedenen Bereichen der technischen Industrie eingesetzt, aber sie sind seit Mitte des 20. Jahrhunderts auch in der Medizin und Pharmazie von wachsendem Interesse (1,37).

Frederic Stanley Kipping (1863-1949), ein englischer Chemiker und Begründer der Siliconchemie, beschäftigte sich intensiv mit organischen Siliciumverbindungen und stellte Anfang des 20. Jahrhunderts eine große Anzahl an Silicium-Kohlenstoffverbindungen her, die er als „silicon ketones“ bezeichnete (38-40). Im Zeitraum von 1901-1944 veröffentlichte er über 50 Beiträge auf dem Gebiet der Siliconchemie (z.B. (41-43)). Durch die großtechnische Herstellung von Methylchlorsilan (ein Ausgangsprodukt für die Siliconsynthese), die durch Richard Müller und Eugene G. Rochow (Müller-Rochow-Synthese) 1940 ermöglicht wurde, war die Synthese von Siliconen auch in großem Maßstab möglich und die Siliconchemie erhielt einen enormen Auftrieb (44).

Silicone sind siliciumhaltige organische Verbindungen, deren Grundgerüst aus alternierenden Silicium- und Sauerstoffatomen besteht (45,46). Die freien Valenzen der Siliciumatome sind mit organischen Resten abgesättigt. Je nach Vernetzungsgrad und Anwendungsgebiet werden Silicone wie folgt eingeteilt:

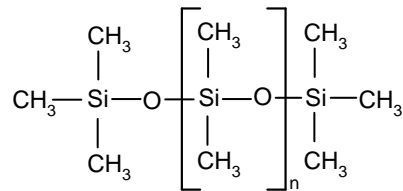
- Siliconöle (siehe Kapitel 2.2.1)
- Siliconkautschuke (Linearpolymer, Anzahl der Kettenglieder $n > 4000$)
- Siliconharze (dreidimensional vernetzte Struktur).

Im Mittelpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stehen Siliconöle. Im folgenden Abschnitt werden Siliconöle hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und Eigenschaften, ihrer industriellen Anwendung sowie ihrer medizinischen Indikation und ihres toxikologischen Verhaltens näher vorgestellt.

2.2.1 Chemische Struktur und Eigenschaften

Siliconöle können polydisperse Gemische unterschiedlich langer und unterschiedlich substituierter linearer Siloxanketten sein (45). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur Polydimethylsiloxane (Methylsiliconöle) verschiedener Kettenlänge eingesetzt, die im weiteren Verlauf allgemein als Siliconöle bezeichnet werden.

Polydimethylsiloxane sind hydrophobe, klare, farb-, geruch- und geschmacklose Flüssigkeiten, die aus einer linearen, unverzweigten Kette aufgebaut sind. Bei den Methylsiliconölen werden die freien Valenzen der Siliciumatome durch Methylgruppen abgesättigt (Abb. 2-2) (45,47). Mit steigender Anzahl n der Kettenglieder im Molekül (siehe Abb. 2-2) nehmen das Molekulargewicht und die Viskosität der Siliconöle stark zu (Tab. 2-1). Auf die Viskosität der verschiedenen Polydimethylsiloxane wird bereits in den Herstellerbezeichnungen der Substanzen hingewiesen (z.B. M1000, siehe auch Tab. 3-1).

**Abb. 2-2:** Strukturformel von Siliconölen (Polydimethylsiloxanen)**Tab. 2-1:** Abhängigkeit des Molekulargewichts, der Viskosität und der Oberflächenspannung der Polydimethylsiloxane von der Anzahl der Kettenglieder n (47)

Anzahl der Kettenglieder n	Molekulargewicht	Kinematische Viskosität $[\text{mm}^2\cdot\text{s}^{-1}]$	Oberflächenspannung $[\text{mN/m}]$
0	162	0,65	15,9
40	3000	50	20,8
70	5000	100	20,9
200	15000	1000	21,2
500	37000	10000	21,5
1000	74000	100000	21,5

Siliconöle verhalten sich bis zu einer Viskosität von $1000 \text{ mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ nahezu idealviskos, bei hochviskosen Siliconölen kann eine Strukturviskosität beobachtet werden (47). Im Vergleich zu Mineralölen weisen Polydimethylsiloxane nur eine sehr geringe Abhängigkeit ihrer Viskosität von der Temperatur und vom Druck auf. Werden jedoch die Methylreste teilweise durch Phenyl- oder höher aliphatische Gruppen ersetzt, wird die Temperaturabhängigkeit der Viskosität verstärkt (1,45,48).

Eine besondere Eigenschaft der Methylsiliconöle ist ihre Fähigkeit, sich auf Oberflächen von Feststoffen und Flüssigkeiten zu Filmen von molekularer Dimension auszubreiten (20,49). Die mit Siliconöl behandelten Oberflächen sind wasserabweisend und führen zu einer verminderten Haftung von klebenden Substanzen. Das Spreitungsvermögen der Polydimethylsiloxane ist jedoch stark abhängig von der Substitution des Siliciumatoms mit Methylgruppen. Durch den Austausch von Methyl- gegen Phenylgruppen werden die Filmbildungseigenschaften der Substanzen an polaren Oberflächen stark vermindert (50). Das gute Filmbildungsvermögen der Polydimethylsiloxane ist auf die schwachen zwischenmolekularen Bindungskräfte der Moleküle zurückzuführen. Diese spiegeln sich auch in ihrer sehr geringen Oberflächenspannung wider, die sich mit zunehmender Viskosität der Siliconöle nur wenig verändert (Tab. 2-1).

Da es sich bei Siliconölen um unpolare Flüssigkeiten handelt, die nicht in Wasser löslich bzw. mit Wasser mischbar sind, erfolgt die Filmbildung auf hydrophoben Oberflächen besser als auf hydrophilen Feststoffen. Auch die Verdrängung von Wasserfilmen von der Phasengrenzfläche Feststoff/Gas durch einen Siliconölfilm ist abhängig von der Affinität des Wassers bzw. des Siliconöls zur Feststoffoberfläche. Die Haftung der Siliconölmoleküle an eine Oberfläche erfolgt über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen.

Das Molekulargewicht der Polydimethylsiloxane hat weiterhin einen Einfluss auf ihr Löslichkeitsverhalten in verschiedenen Lösemitteln. Interessant ist außerdem, dass Siliconöle eine hohes Lösungsvermögen für verschiedene Gase wie z.B. Sauerstoff und Stickstoff besitzen (51).

Aufgrund der Beständigkeit ihrer anorganischen Si-O-Bindung sind Siliconöle chemisch sehr inerte Substanzen, die eine ausgeprägte Lagerstabilität aufweisen (1).

2.2.2 Industrielle Anwendung

In der Industrie finden Polydimethylsiloxane aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften unter anderem Anwendung als Schmier- und Gleitmittel, Formtrennmittel, Entschäumer oder dielektrisches Kühlmittel (1,47). Siliconöle werden auch in Form von Emulsionen (siehe auch Kapitel 2.2.5) zur Beschichtung von verschiedenen Materialien wie z.B. pharmazeutische Gläser und Keramik eingesetzt. Durch die Hydrophobisierung von Flaschen oder Ampullen aus Glas werden diese von wässrigen Lösungen praktisch nicht mehr benetzt und ein gutes Ablaufverhalten von hydrophilen Inhalten sowie eine nahezu vollständige Entleerung der Gefäße wird gewährleistet (52).

Siliconöle kommen außerdem als Hilfsstoffe in zahlreichen kosmetischen Formulierungen zum Einsatz. Sie sollen das Spreitungsvermögen von Hautpflegeprodukten verbessern und eine atmungsaktive Schutzschicht auf der Haut bilden (siehe auch Kap. 2.2.6; *Dermatologische Zubereitungen*). Weiterhin setzt man sie in Haarpflegeprodukten und Sonnenschutzformulierungen ein (47).

2.2.3 Dimeticon und Simeticon

Polydimethylsiloxane, die als Arzneistoffe eingesetzt werden, werden als Dimeticone bezeichnet. Für die Anwendung in pharmazeutischen Zubereitungen müssen Dimeticone den Anforderungen der Monographie des Europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur.) entsprechen (53). Auch in der United States Pharmacopeia (USP/NF) ist Dimeticon monographiert, wobei sich jedoch die Anforderungen beider Arzneibücher unterscheiden (siehe Tab. 2-2) (54). Dimeticone mit einer kinematischen Viskosität von $50 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und weniger sind im Gegensatz zu höher viskosen Dimeticonen laut Ph. Eur. nicht zur inneren, sondern nur zur äußerlichen Anwendung bestimmt.

Durch den Zusatz von 4 bis 7 % hochdispersen Siliciumdioxid (SiO_2) zu Polydimethylsiloxan erhält man Simeticon (nach Ph. Eur. und USP; Polydimethylsiloxangehalt 90.5 % bis 99.0 %) (55,56).

Tab. 2-2: Anforderungen der verschiedenen Arzneibücher (53,54)

	Dimeticon	
Arzneibuch	<i>Ph. Eur. 6.00</i>	<i>USP 31/ NF 26</i>
Polymerisationsgrad	n = 20-400	—
Viskosität [$\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	20-1300	20-30000

Für die Herstellung von Simeticon (auch als aktiviertes Dimeticon bezeichnet) wird Dimeticon 30 Minuten mit der entsprechenden Menge hochdispersen Siliciumdioxids auf 150°C erhitzt (57).

In einer in-vivo-Studie von Birtley et al. konnte 1973 gezeigt werden, dass Simeticon (6 % SiO₂) im Vergleich zu Dimeticon eine deutlich höhere Aktivität als Entschäumer besitzt (3). Spektroskopische Untersuchungen von Buist et al. wiesen auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Siliciumdioxid und den Polydimethylsiloxanen hin (58). Durch die Adsorption des hydrophilen Siliciumdioxids an das Dimeticon wird die Hydrophobizität des Dimeticons vermindert. Simeticon kann somit schneller und effektiver mit der Schaumoberfläche interagieren. Außerdem wurden beide Substanzen hinsichtlich ihrer Schleimhaut-schützenden Wirkung im Magen von Ratten untersucht, wobei jedoch keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren (3).

2.2.4 Toxizität

Für den therapeutischen Einsatz von Siliconölen sind das physiologische Verhalten und das toxikologische Potenzial dieser Substanzgruppe von größter Bedeutung. Die Toxizität von Dimeticonen wurde in zahlreichen Studien beurteilt und es konnte gezeigt werden, dass eine physiologische Indifferenz erst bei höher molekularen Verbindungen auftritt (18).

In tierexperimentellen und humanen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass Dimeticone nach oraler Applikation nahezu nicht resorbiert und unverändert ausgeschieden werden. Nur sehr niedermolekulare Siliconöle wurden aufgenommen und waren im Urin bzw. der Atemluft nachweisbar. Anhand verschiedener Tierversuche (Mäuse, Ratten, Meerschweinchen) konnte außerdem gezeigt werden, dass Dimeticon keine akute orale Toxizität LD₅₀ besitzt. Auch in Kurz- und Langzeitstudien zur oralen Toxizität konnten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen festgestellt werden. Auffallend war nur, dass bei der Gabe von niedrig viskosen Siliconölen eine Darmstörung (anal leakage) bzw. auch bei höher molekularen Siliconölen eine abführende Wirkung auftrat. Weiterhin führte man Untersuchungen zur Reproduktions- und Entwicklungstoxizität nach oraler Applikation von Dimeticon in Ratten und Kaninchen durch, bei denen keine negativen Auswirkungen beobachtet werden konnten. Auch bei in-vitro-Studien zur Gentoxizität wurden keine mutagenen Eigenschaften nachgewiesen (18,19).

Höher polymere Polydimethylsiloxane sind nicht mehr flüchtig und ihre physiologische Wirkung bei Inhalation kann folglich nicht an Dämpfen studiert werden. Aus diesem Grund erfolgte die Beurteilung der Wirkung durch Inhalation anhand von Nebeln und Aerosolen, wobei keine auffälligen Befunde zu beobachten waren. Im Gegensatz dazu konnten bei der Inhalation einer hohen Konzentration (gesättigte Atmosphäre) des niedermolekularen, flüchtigen Hexamethyldisiloxan, toxische Effekte bei Meerschweinchen beobachtet werden (19).

Die dermale Toxizität von Dimeticon für Ratten und Kaninchen wurde in einer Studie mit einer LD₅₀ > 2 g/kg bestimmt. In dermalen Untersuchungen wurden Dimeticone als geringe Reizstoffe eingestuft (18). Eine Studie von Rowe et al. zeigte jedoch, dass auch nach 20 Behandlungen der rasierten

Bauchhaut von Kaninchen mit nieder- und hochmolekularen Siliconölen keine negativen Folgen auftraten (59). Bei der Beurteilung der epithelverdickenden Wirkung an der Haut im Vergleich zu Paraffinöl und Vaseline, bei denen eine deutliche Verdickung der Oberhaut zu beobachten war, war dieser Effekt bei den mit Siliconöl-behandelten Proben nicht nachweisbar (60,61). Siliconöle sind somit als unproblematisch für die Anwendung auf der Haut auch über einen längeren Zeitraum einzustufen.

Bei der Anwendung von Polydimethylsiloxanen am Auge traten geringe Reizungen auf (siehe auch Kapitel 2.2.6).

Kontrovers wird die Toxizität von injizierten Dimeticonen diskutiert. In zahlreichen Studien konnte eine gute biologische Verträglichkeit von i.p., s.c. oder i.m. injizierten Siliconölen nachgewiesen werden, welche von Makrophagen sowie Monozyten und Neutrophilen phagozytiert werden (19,62). Allerdings wurden nach Injektionen von Siliconölen immer wieder Immunreaktionen beobachtet (63). Da Siliconöle biokompatibel, aber nicht bioabbaubar sind (64), sollte bei den verschiedenen parenteralen Applikationsformen eine chronische Siliconölgabe vermieden werden.

Problematischer ist dagegen die intravenöse Applikation. Im Tierversuch traten nach i.v. Applikation einer Simeticon-Emulsion pulmonale embolische Prozesse mit Todesfolge oder chronische Lungenfibrosen auf (65). Der Transport der Öltropfen mit dem Blut führt zu einem Verschluss der kleinen Gefäße. Eine solche Fettembolie tritt jedoch nicht nur nach der i.v. Applikation von Siliconölen auf, sondern beispielsweise auch, wenn Fetttropfen nach Knochenbrüchen oder stumpfen Traumen vom Fettgewebe in die Blutbahn gelangen (66). Die Toxizität der Siliconöle nach i.v. Applikation hat folglich eher physikalische Ursachen, die aufgrund der nicht vorhandene Bioabbaubarkeit der Siliconöle verstärkt wird.

2.2.5 Siliconölemulsionen

Siliconöle werden in vielen Bereichen nicht als reine Öle angewendet, sondern in Form von Öl-in-Wasser-Emulsionen. Der Vorteil dieser Emulsionen ist die Möglichkeit, die Zubereitungen mit Wasser stark zu verdünnen und somit einen äußerst wirtschaftlichen Einsatz zu ermöglichen (1). Auch bei der Anwendung von Siliconölen als Therapeutikum ist die Emulsionsform insbesondere bei der oralen Applikation von Vorteil, da so eine bessere Compliance der Patienten als bei der Gabe des reinen Öls gewährleistet werden kann.

Aufgrund der hohen Grenzflächenspannung an der Phasengrenzfläche Wasser/Siliconöl lassen sich Siliconöle schwerer in Emulsionsform überführen als andere pharmazeutische Öle, z.B. Paraffinöle (67) (Emulsionsherstellung siehe Kapitel 4.1).

2.2.6 Medizinische Anwendung

Gastroenterologie

Ein wichtiges Einsatzgebiet von Dimeticon bzw. Simeticon in der Medizin ist die Gastroenterologie. Aufgrund ihrer hohen Oberflächenaktivität werden insbesondere Simeticone bei übermäßiger Gasbildung bzw. zur Beseitigung störender Gasansammlungen im Magen-Darm-Bereich (Meteorismus) verwendet (3,68). Die frei werdenden Verdauungsgase werden von der Darmwand resorbiert sowie durch die Darmperistaltik auf natürlichem Wege eliminiert. Zur Therapie des Meteorismus stehen im Handel verschiedene freiverkäufliche Simeticon-Präparate wie zum Beispiel Lefax[®], Sab Simplex[®] oder Espumisan[®] zur Verfügung.

Weiterhin kann durch die Vorbehandlung von Patienten mit Simeticon eine Verbesserung der Qualität von endoskopischen und sonographischen Untersuchungen des Gastrointestinaltraktes infolge der Reduzierung von Gasschatten beobachtet werden (69-72).

Eine große Bedeutung hat der Einsatz von Dimeticon bzw. Simeticon auch als Antischaummittel bei Tensidintoxikationen (73). In Deutschland ist jede Apotheke laut Apothekenbetriebsordnung Anlage 3 (zu §15 Abs. 1 Satz 2) verpflichtet, entsprechende Arzneimittel für den Notfall vorrätig zu halten.

Der Einsatz von Simeticon-Präparaten bei Säuglingskoliken wird dagegen kontrovers diskutiert. Ein positiver Einfluss von Simeticon auf den Verlauf von Säuglingskoliken konnte in verschiedenen klinischen Studien nicht nachgewiesen werden (74). Insbesondere in vergleichenden Studien mit dem Probiotikum *Lactobacillus reuteri* bzw. einer neuen Rezeptur von Molkeproteinen und Präbiotika stellte man keinen Vorteil des Simeticon-Einsatzes fest (75,76). In Deutschland wurde von Mai 2002 bis Januar 2003 eine zweiarmige apotheken- und arztgestützte Anwendungsbeobachtung durchgeführt, die die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Lefax[®] Pump-Liquid bei Säuglingskoliken beurteilen sollte (77). Hier konnte wie auch bereits von Sethi et al. (78) gezeigt werden, dass die Anwendung von Simeticon zu einer Besserung der Koliken führt. Eine abschließende Beurteilung des therapeutischen Effekts von Simeticon bei Säuglingskoliken ist somit nur schwer möglich.

Außerdem wurde die Wirksamkeit von Simeticon bei funktioneller Dyspepsie, dem so genannten Reizmagen, untersucht. In verschiedenen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Simeticon im Vergleich zu Placebo und auch zu dem Prokinetikum Cisaprid zu einer deutlichen Verbesserung der Symptomatik führt (79-81).

Simeticon wird jedoch nicht nur als Monopräparat eingesetzt, sondern findet auch Anwendung in der Kombination mit anderen Wirkstoffen. Ein Beispiel dafür ist Imodium[®] akut plus, die Kombination von Loperamid und Simeticon. In einer Studie von Kaplan et al. konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Loperamid und Simeticon bei akutem Durchfall zu einer schnelleren Besserung der Symptome führte als die alleinige Einnahme des lokal wirksamen Opioids Loperamid (82). Auch die Patientengruppe, die nur Simeticon (ohne Loperamid) zur Therapie der akuten Diarrhö bekam, zeigte einen leicht gesteigerten therapeutischen Effekt im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Der genaue Wirkmechanismus der Loperamid-Simeticon-Kombination ist nicht bekannt. Von Conner et al.

wurden eine erhöhte Verweildauer des Kombinationspräparates im Vergleich zum Monopräparat von Loperamid nachgewiesen (83). Dies könnte auf eine mögliche Interaktion von Loperamid und Simeticon zurückgeführt werden, die eine langsamere Freisetzung des Loperamids bedingt und somit zu einer längeren Verfügbarkeit von geringeren Loperamidkonzentrationen führt. Außerdem wurde ein Filmbildungseffekt von Dimeticon bzw. Simeticon auf der Darmmucosa sowie ein Schutz der Magen- und Darmmucosa nach oraler Dimeticon-Applikation beobachtet (3,4).

Ein weiteres Kombinationspräparat ist Enzym Lefax[®] zur Behandlung der Maldigestion. Durch die Kombination des Verdauungsenzyms Pankreatin mit Simeticon werden einerseits die Verdauungsfunktion unterstützt und andererseits Gasansammlungen im Magen-Darm-Trakt reduziert (84).

Auch die Kombination von Simeticon mit Antazida zur Therapie der Refluxösophagitis wird in der Literatur diskutiert. Die Kombination eines Antazidum-Gels (enthält $\text{Al}(\text{OH})_3$ und MgO) mit Simeticon führte in einer Studie zu einer etwas verbesserten Symptomatik im Vergleich zum Monopräparat (85). Jedoch konnte bei der Gegenüberstellung verschiedener Kombinationspräparate (Dimeticon/Antazidum \leftrightarrow Alginat/Antazidum) kein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit festgestellt werden (86). Die Kombination von Simeticon und Algeldrat ($\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel) ist zur symptomatischen Behandlung von Oberbauchbeschwerden in der Apotheke erhältlich (Paractol[®]).

In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass Simeticon bei verschiedenen Indikationen, bei denen eine entschäumende und abdeckende Wirkung erwünscht ist, in der Gastroenterologie von Nutzen ist (2). Es wurden auch erste Untersuchungen hinsichtlich des therapeutischen Potenzials von Simeticon (Lefax[®]) bei *Helicobacter pylori*-Infektionen durchgeführt (9). In dieser in-vitro-Studie von Ansorg et al. konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* empfindlich gegenüber Simeticon reagiert und ein antibakterieller Effekt auftritt. Außerdem wurden weitere Bakterienstämme (z.B. *P. aeruginosa*, *S. aureus*) in die Untersuchung einbezogen, die jedoch nicht in ihrer Vitalität beeinträchtigt wurden.

Aufgrund der inerten Eigenschaft von höher molekularen Siliconölen sind bei der oralen Anwendung keine Nebenwirkungen zu erwarten (siehe auch Kapitel 2.2.4). In Einzelfällen wurde jedoch ein Einfluss von Simeticon auf das Resorptionsverhalten von anderen Arzneistoffen wie z.B. Carbamazepin beobachtet (87).

Zahnmedizin

Auch in der zahnmedizinischen Forschung wird der Nutzen von Siliconölen bereits seit den 1950er Jahren diskutiert (88,89). Ellingsen bzw. Rolla et al. untersuchten den Einfluss von Triclosan-haltigen Siliconözübereitungen (Zahnpasta und Lösung) auf die Plaque-Bildung und den Verlauf einer ausgeprägten Gingivitis (6,90). Sie konnten zeigen, dass durch die Kombination von Polydimethylsiloxanen und dem wirksamen Antiseptikum Triclosan die Plaquebildung deutlich reduziert werden kann und eine signifikante Verbesserung der Gingivitis durch die Anwendung einer Siliconöl/Triclosan-haltigen Zahnpasta erzielt wird. Der Siliconölfilm auf der Zahnoberfläche dient als Reservoir für das Triclosan, das aufgrund seines hydrophoben Charakters nur langsam in die Mund-

höhle abgegeben wird und somit länger verfügbar ist. Dies führt zu einer erhöhten Wirksamkeit des Antiseptikums, insbesondere im Vergleich zu anderen Formulierungen (91,92). Interessant ist jedoch auch, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht nur die Triclosan-haltigen Zubereitungen, sondern auch das reine Siliconöl einen positiven Effekt aufweist. Bei Vorhandensein eines Siliconölfilms auf der Zahnschmelzoberfläche wurde eine veränderte Zusammensetzung der Pellicle-Schicht (Eiweißschicht) beobachtet, auf der sich Keime der Mundflora ansiedeln (93).

Durch die Behandlung von Hydroxylapatit-Puder (Bestandteil des Zahnschmelzes) mit Siliconöl wird die Adsorption von Proteinen gegenüber dem unbehandelten Hydroxylapatit-Puder deutlich verringert (93). Eine veränderte Pellicle-Schicht sowie eine verminderte Adsorption von Proteinen an der Zahnoberfläche könnten somit zu einer geringeren Plaquebildung auf mit Siliconöl behandelten Zahnoberflächen beitragen. Auch Guan et al. konnten eine verminderte Adhäsion von Bakterien auf einer mit Hydroxylapatit beschichteten Oberfläche, die anschließend mit verschiedenen Siliconverbindungen behandelt wurde (Dimeticon bzw. Dimeticon-Copolyole), beobachten (5).

Weiterhin kann durch die Behandlung von Glasoberflächen mit Siliconöl die Adsorption von Bakterien im Vergleich zu unbehandelten Oberflächen deutlich reduziert werden (6). Dies könnte auf die durch die Siliconöl verminderte Oberflächenspannung zurück geführt werden, was in der Literatur kontrovers diskutiert wird (94-96).

Augenheilkunde

Ein weiteres Einsatzgebiet von Siliconölen ist die Augenheilkunde. 1962 wurden sie in die vitreoretinale Chirurgie als intraokulare Tamponade eingeführt. Die primäre Wirkung von Siliconöl im Auge ist eine dauerhafte mechanische Tamponade der Netzhaut mit dem Verschluss retinaler Defekte (97). Außerdem werden eine Limitierung von postoperativen Blutungen und eine Dekompartimentierung im Auge diskutiert.

Für die Tamponade werden insbesondere Siliconöle mit einer Viskosität von $1000 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und $5000 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ verwendet. Kurzkettige Siliconöle mit einer geringen Viskosität sind dagegen für den Einsatz am Auge ungeeignet. Sie können durch den interzellulären Spaltraum diffundieren und die Zellmembran durchdringen. Als Folge werden die Siliconöle von Makrophagen phagozytiert. Dieser Effekt tritt jedoch nicht nur bei niedrigviskosen Siliconölen auf, sondern wurde auch in einem geringeren Maße bei hochviskosen Verbindungen beobachtet (98-100). Die Siliconöle werden vor der Phagozytose durch die Makrophagen zunächst mittels verschiedener Plasmaproteine emulgiert (101). Als Komplikationen bei der Anwendung von Siliconöltamponaden im Auge sind Kataraktbildung, Entstehung von Siliconöl-induziertem Glaukom und bandförmige Keratopathien beschrieben worden (97,102-105).

In der Netzhautchirurgie wurde in den letzten Jahren auch der Einsatz von schweren Ölen untersucht (106,107). Siliconöle werden dazu beispielsweise in Fluorhexyloktan (Densiron® 68) gelöst. Die schwere Siliconöllösung ($\rho=1,06 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) besitzt im Gegensatz zum reinen Siliconöl ($\rho=0,97 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

eine höhere Dichte als Wasser und wird klinisch bei inferioren und zentralen Netzhautablösungen eingesetzt.

Interessant sind die Beobachtungen zur antimikrobiellen Aktivität von Siliconölen in Bezug auf die Erreger der Endophthalmitis. In-vitro-Untersuchungen von Özdamar et al. zeigten, dass nach Zugabe von *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* zu reinem Siliconöl ($1300 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-2}$) eine Abnahme der Keimzahl auftrat (7). Siliconöle wiesen auch eine antimikrobielle Aktivität gegenüber *Aspergillus niger* auf (8). In einer kleinen klinischen Studie wurde über den positiven Effekt von Siliconöl bei der Endophthalmitis diskutiert (108).

Dermatologische Zubereitungen

Dimeticone finden weiterhin Anwendung in der Dermatologie. Sie werden in Form von verschiedenen Zubereitungen als Hautschutzmittel bei Windeldermatitis, allergischer Kontaktdermatitis und bei Dermatitis infolge von Harn- bzw. Stuhlinkontinenz sowie zur Prophylaxe von Dekubitus eingesetzt (51,109,110). Auf der Haut bildet sich eine Schutzschicht, welche den Gasaustausch der Haut jedoch nicht unterbindet (47). Auch eine eventuelle protektive Wirkung einer Dimeticon-Schutzcreme bei der so genannten Badermatitis, die durch Larven bestimmter Trematoden (Saugwürmer) hervorgerufen wird, wurde untersucht (111,112).

Außerdem werden Dimeticone seit einigen Jahren in Form von Lösungen zur physikalischen Behandlung des Kopfhaares bei Befall mit Kopfläusen eingesetzt (Etopril®, NYDA®). Das Dimeticon lagert sich dabei auf den Atemöffnungen von Läusen, Larven und Nissen ab. Aufgrund seiner Kriechfähigkeit dringt es schnell in alle Verzweigungen des Atemsystems vor und kleidet das Tracheensystem aus (113). Diese Störung der Atmung führt zum Tod der Parasiten durch Ersticken. Die Wirksamkeit der Dimeticon-Lösungen ist vergleichbar bzw. besser als die anderer Pedikulozid-Präparate (114-116). Aufgrund der rein physikalischen Wirkung von Dimeticon ist im Gegensatz zu anderen, neurotoxisch wirkenden Pedikuloziden (z.B. Phenothrin, Malathion) auch bei wiederholter Anwendung keine Toxizität und kein Resistenz- bzw. Allergierisiko zu erwarten (117).

Beschichtung von medizinischen Produkten

Siliconöle werden außerdem zur Siliconisierung der Oberflächen von Spritzen und Nadeln eingesetzt. Durch diese Oberflächenbehandlung wird die Injektion erleichtert und somit die Schmerzen an der Einstichstelle reduziert (118). Die Beschichtung von Kathetern und Schläuchen für verschiedene medizinische Anwendungen (z.B. Blasenkatheter) erfolgt dagegen meist mit Siliconelastomeren (119).

Es konnte also gezeigt werden, dass Siliconöle aufgrund ihrer besonderen Grenzflächeneigenschaften (Filmbildungseigenschaften, Wirkung als Entschäumer), ihrer guten physiologischen Verträglichkeit und einer in verschiedenen Studien beobachteten antimikrobiellen Wirkung in der Medizin für die verschiedensten Indikationen von Bedeutung sind. Insbesondere in der Gastroenterologie nehmen Dimeticon und Simeticon eine wichtige Stellung ein.

2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die beiden Hauptformen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sind Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) (16). Die Colitis ulcerosa ist eine auf den Mast- und Dickdarm beschränkte, in Schüben verlaufende Entzündung, die sich kontinuierlich von distal nach proximal ausbreitet. Dagegen kann der Morbus Crohn den gesamten Magen-Darm-Trakt, von der Mundhöhle bis zum After, befallen (Abb. 2-3). Typisch für MC ist die diskontinuierliche Ausbreitung, das bedeutet, dass gleichzeitig mehrere Darmabschnitte erkrankt sein können, die durch gesunde Darmpassagen voneinander getrennt sind.

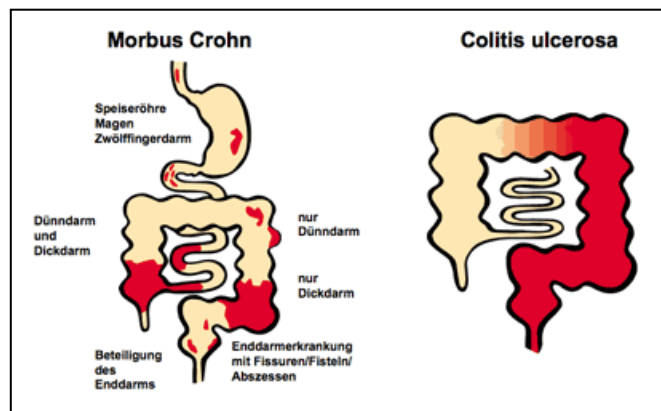


Abb. 2-3: Lokalisation von MC und CU im Gastrointestinaltrakt (120)

Die Ausbreitung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist ein weltweites Problem. Die größte Prävalenz der CED wird für Nordeuropa, Großbritannien und Nordamerika berichtet, wo sich jedoch die Inzidenz in den letzten Jahren stabilisiert hat (121,122). In anderen Gebieten der Welt (z.B. Asien, Zentraleuropa) nimmt die Häufigkeit der Erkrankung dagegen zu. Allein in Europa leiden 2,2 Millionen Menschen an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung. In Deutschland werden jährlich ca. 5 Neuerkrankungen an MC unter 100.000 Einwohnern beobachtet, die Inzidenz von CU ist dagegen geringer (123,124).

2.3.1 Pathogenese

Die genaue Ursache der CED ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass genetische Mechanismen und eine fehlerhafte Regulation des intestinalen Immunsystems von Bedeutung sind. Auch äußere Einflüsse wie psychischer Stress, Ernährung oder das Aufwachsen in einer zu hygienischen Umgebung sowie die intestinale Mikroflora spielen eine Rolle in der Pathogenese der CED (122,125,126). Im Folgenden werden die einzelnen Faktoren, die zur Entstehung der CED beitragen, näher betrachtet.

Genetische Faktoren

Die Anamnese von Patienten zeigte eine gehäufte Prävalenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in der Familie und deutet zusammen mit den Ergebnissen von Zwillingsstudien auf eine genetische Prädisposition hin (127-129). In genetischen Untersuchungen konnten bereits Suszeptibilitätsregionen auf verschiedenen Chromosomen nachgewiesen werden, die Identifikation eines definierten Krankheitsgens war jedoch für CU noch nicht erfolgreich (122,130). Dagegen konnte 2001 erstmals für MC auf dem Chromosom 16q ein Krankheitsgen, das CARD15/ NOD2-Gen, identifiziert werden (131,132).

Die Kombination einer genetischen Suszeptibilität von Patienten mit bestimmten Umweltfaktoren kann die Manifestation einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung auslösen, wobei bakterielle Antigene anscheinend eine Schlüsselrolle spielen (133).

Intestinales Immunsystem

Ein gesunder menschlicher Darm steht im engen Zusammenhang mit einer gesunden Darmflora, einer intakten Darmbarriere sowie einem regulierten intestinalen Immunsystem (gut associated lymphoid tissue [GALT]) (134). Die Immunabwehr im Darm wird dabei in eine angeborene und erworbene Komponente unterteilt. Das angeborene Immunsystem ist mit Hilfe spezialisierter Rezeptoren in der Lage, pathogene und apathogene Keime zu unterscheiden. Bestimmte Bausteine der Mikroorganismen (Lipopolysaccharide, Flagellin und Peptidoglykane der Bakterienzellwand) werden von den Toll-like-Rezeptoren (TLR) und NOD-Rezeptoren erkannt (135). Nach der Bindung der bakteriellen Bestandteile an die entsprechenden Rezeptoren wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert (136). Die dadurch folgende Zytokinfreisetzung führt zur Stimulierung verschiedener T-Lymphozyten, die die pathogenen Keime eliminieren.

Das erworbene Immunsystem besteht aus einer humoralen und zellulären Komponente (137). Bei der humoralen Abwehr werden durch spezifische Antigene im Darm B-Lymphozyten aktiviert, die vor allem das Immunglobulin A bilden. Dieser Antikörper bindet mikrobielle Antigene und verhindert so deren Adhäsion an der Darmoberfläche. Dagegen erfolgt die zelluläre Immunabwehr bei bakteriellen Infektionen durch verschiedene T-Lymphozyten sowie mit Hilfe von Makrophagen und Mastzellen.

Auch im gesunden Zustand ist der Darm einer hohen Antigenkonzentration (aus Nahrung, Bakterien) ausgesetzt. Aus diesem Grund weist das intestinale Immunsystem zum Schutz des eigenen Organismus eine Hyporeaktivität, eine immunologische Toleranz, auf (138). Die Balance zwischen der Toleranz von intestinalen Bakterien sowie von Antigenen und der erforderlichen Reaktion gegen pathogene Organismen ist bei der CED gestört. Bei einem gesunden, regulierten intestinalen Immunsystem wird bei der Abwehr von Bakterien und Antigenen über die antiinflammatorische Immunantwort (Th2-vermittelt) die Produktion antiinflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin 10, stimuliert. Dieser Mechanismus findet jedoch bei der CED nur unzureichend statt und somit kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung des mukosalen Immunsystems. Außerdem ist eine gesteigerte

Aktivierung von T-Helferzellen ($CD4^+$) in der Darmwand beobachtet worden, die eine vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1, IL-12, TNF- α) bedingt (139). Diese $CD4^+$ T-Helferzellen differenzieren zu Th1- und Th2-Zellen, die sich in ihrem Zytokinprofil unterscheiden. Die von den Th1-Zellen produzierten Zytokine INF- γ , TNF- α und IL-2 sind bei MC vorherrschend. Aus diesem Grund ist MC als Th1-vermittelte Erkrankung anzusehen, bei der CU dagegen ist keine eindeutige Zuordnung möglich (140).

Die verstärkte Aktivierung des intestinalen Immunsystems wird auch durch die Mutation des NOD2-Rezeptors bei MC-Patienten gefördert. An der Entzündungsreaktion sind, wie bereits erwähnt, die NOD2-Rezeptoren und die Toll-like-Rezeptoren beteiligt (125). Durch die Bindung von Peptidoglykanen der bakteriellen Zellwand an den Toll-like-2-Rezeptor erfolgt eine proinflammatorische Reaktion. Gleichzeitig interagiert ein Abbauprodukt des Peptidoglykans mit dem NOD2-Rezeptor und hemmt dadurch die Entzündungsreaktion (141). Ist jedoch der NOD2-Rezeptor mutiert, kann das Abbauprodukt des Peptidoglykans nicht binden und die Inflammation wird nicht gebremst.

Intestinale Barriere

Wichtig für die Homöostase im Darm ist auch eine intakte intestinale Barriere (12). Diese wird von Epithelzellen gebildet, die durch Tight junctions (Zellbrücken) miteinander verbunden werden. Die Zellbrücken bieten dem Darmepithel einen zusätzlichen Schutz gegen das Eindringen von Mikroorganismen. Neben der Barrierefunktion ist diese epitheliale Schicht auch verantwortlich für den Transport von Flüssigkeiten, Ionen und Nährstoffen sowie für die Wahrnehmung immunologischer Aufgaben. Im physiologischen Zustand ist das Darmepithel apikal noch zusätzlich von Mukus, einer Schutzschicht aus Schleim, überzogen. Diese Schleimschicht besteht zu 90 % aus Wasser sowie aus Muzinen, die eine wichtige Rolle für die Barrierefunktion der Schleimhaut und die Regulation der Zelladhäsion spielen. Zusammen mit apathogenen Bakterien der intestinalen Flora verstärkt der Mukus die Darmbarriere.

Interessanterweise wurde bei Patienten mit einer CED eine erhöhte Permeabilität der intestinalen Barriere vor und während eines Entzündungsschubes, sowohl für befallene als auch für nicht befallene Darmabschnitte, beobachtet (10,142,143). Im gesunden Zustand ist die intestinale Barriere undurchlässig für Makromoleküle, partikuläre Antigene und Mikroorganismen. Nur durch spezialisierte intestinale Epithelzellen, die M-Zellen, können beispielsweise intestinale Bakterien aufgenommen werden. Durch M-Zellen wird jedoch auch der Durchtritt von pathogenen Bakterien durch das Darmepithel ermöglicht, die anschließend mit Hilfe des intestinalen Immunsystems inaktiviert werden. Aufgrund einer überschießenden Aktivierung von Epithelzellen bei der CED tritt eine Zunahme der M-Zellzahl auf, die eine gesteigerte Aufnahme von pathogenen Bakterien zur Folge hat. Die vermehrte Interaktion von Lipopolysacchariden der gramnegativen Bakterien mit dem Toll-like-4-Rezeptor sowie von Peptidoglykan mit dem Toll-like-2-Rezeptor führt zu einer gesteigerten Immunantwort (siehe *Intestinales Immunsystem*) (144).

Darmflora

Die Darmflora eines gesunden Menschen enthält ein Gleichgewicht von apathogenen (z.B. *Bifidobakterien*, *Laktobazillen*) und pathogenen (z.B. *Clostridien*, *E. coli*) Mikroorganismen (14). Zur Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes werden von verschiedenen Bakterienstämmen so genannte Bacteriocine, proteinogene Toxine, abgesondert, die das Wachstum pathogener Keime inhibieren (145). Auch durch die Defensine, die von den Panethzellen der intestinalen Barriere gebildet werden, wird die Vermehrung der pathogenen Bakterien limitiert. Wehkamp et al. konnten zeigen, dass insbesondere bei Morbus Crohn eine verringerte Expression von α - und β -Defensinen auftritt und somit eine unkontrollierte Vermehrung von pathogenen Bakterien der intestinalen Flora erfolgen kann (146,147). In verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen konnte weiterhin beobachtet werden, dass transgene Tiere nur dann an einer CED erkrankten, wenn sie unter normalen Bedingungen gehalten wurden. Waren die Aufzuchtbedingungen dagegen steril, blieben die Tiere gesund (148-150).

Außerdem hat man nachgewiesen, dass bei Patienten mit MC oder CU eine veränderte intestinale Flora, mit einem größeren Anteil an pathogenen Bakterien (z.B. *Escherichia coli*, *Mycobakterium paratuberculosis*) als bei gesunden Menschen, vorherrscht (11,151-153). Durch die Störung der intestinalen Flora und eine verstärkte Adhäsion von pathogenen Mikroorganismen an der Epithelschicht werden die Tight junction der intestinalen Barriere zerstört. Die pathogenen Mikroorganismen können somit leichter ins Epithel eindringen und eine akute Entzündungsreaktion hervorrufen (154,155).

Das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten, die in diesem Abschnitt (Kap. 2.3.1) für die Pathogenese von CED diskutiert wurden, führt schließlich zur Ausbildung und zur Manifestierung von CU oder MC.

2.3.2 Klinik und Diagnose

Die klinischen Symptome der MC und CU treten als Folge der entzündlichen Veränderung der Darmwand auf. Häufig beobachtete Krankheitsmerkmale des MC sind Diarrhö mit Schleimbeimengungen, Schmerzen im rechten Unterbauch sowie Fieber und Gewichtsverlust (156). Im Gegensatz zur CU, die nur eine Erkrankung der Mukosa darstellt, sind beim MC alle Darmwandschichten (transmural) befallen. Bei der CU sind blutige, ggf. auch blutig-schleimig-eitrige Durchfälle das Leitsymptom der Erkrankung (157). Aber auch hier treten Abdominalschmerzen auf, jedoch im linken Unterbauch mit kolikartigem Charakter und Defäkationsdrang (Tenesmen) sowie unspezifische Krankheitsanzeichen wie Fieber und Gewichtsverlust.

Problematisch sind die im Krankheitsverlauf auftretenden Komplikationen. Bei MC können perianale Veränderungen wie Fisteln und Abszesse sowie Stenosen und Strikturen beobachtet werden (158). Das toxische Megakolon, eine deutliche Erweiterung des Kolons, ist eine lebensbedrohliche Komplikation der CU, die aber auch selten bei MC vorkommen kann (159). Das Krankheitsbild ist geprägt

durch ein schmerzhaftes akutes Abdomen, hohes Fieber, Tachykardie und die Gefahr einer Darmperforation mit nachfolgender Peritonitis. Außerdem besteht insbesondere bei der CU nach langem Krankheitsverlauf ein erhöhtes Risiko für ein kolorektales Karzinom (160,161).

Neben den Komplikationen im Gastrointestinaltrakt können auch extraintestinale Begleiterscheinungen bei der CED auftreten, die zu zusätzlichen Beschwerden führen. Dabei können beispielsweise die Augen (Uveitis, Episkleritis), die Gelenke (Arthritis, ankylosierende Spondylitis) sowie die Haut (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum) betroffen sein (162,163).

Die Diagnose der CED wird meist durch die Kombination der klinischen Symptome mit den Befunden von radiologischen, endoskopischen, histologischen und laborchemischen Untersuchungen gestellt (16). Zum Ausschließen von infektiösen Ursachen ist auch eine mikrobiologische Stuhluntersuchung von Bedeutung.

Die differentialdiagnostische Unterscheidung zwischen MC und CU ist häufig schwierig, da die klinischen Symptome ähnlich sind. MC und CU unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer histopathologischen Befunde. Im Vergleich zu MC, bei dem eine typische Granulombildung nachweisbar ist, ist bei der CU besonders eine gestörte Kryptenarchitektur charakteristisch (164,165). Bei beiden Erkrankungen wird bei einem akuten Schub eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten sichtbar.

2.3.3 Therapie

Für die CED bestehen grundsätzlich zwei Behandlungsansätze, die medikamentöse und die chirurgische Therapie. Im folgenden Abschnitt werden jedoch nur die Möglichkeiten der medikamentösen Therapie näher erläutert.

Da die Pathogenese der CED bis heute noch nicht vollständig geklärt ist, beruht die Behandlung von CU und MC oft auf einer unspezifischen Hemmung der Entzündungsreaktion und einer Wiederherstellung des Gleichgewichts der pro- und antiinflammatorischen Immunreaktion.

Die Wahl des Medikamentes, die Dosis und die Therapiedauer richten sich nach dem Schweregrad, der Aktivität und der Lokalisation der CED. Die Zielsetzung einer optimalen Therapie sollte die Induktion einer Remission sein. In Tab. 2-3 sind verschiedene Substanzgruppen mit entsprechenden Wirkstoffen sowie häufig auftretenden Nebenwirkungen dargestellt, die heute zur Behandlung von MC und CU zum Einsatz kommen (16,17,164). Diese Substanzen führen infolge unterschiedlicher Wirkmechanismen zu einer Verminderung der Entzündung im Darm, weisen aber zum Teil starke Nebenwirkungen auf. Die Arzneistoffe werden sowohl einzeln als auch in Kombination verordnet und werden in verschiedenen Applikationsformen (z.B. oral, topisch oder i.v.) angewendet.

Außerdem werden einige schon längst bekannte Wirkstoffe wie Heparin (Blutgerinnungshemmer) oder Thalidomid sowie weitere Immunsuppressiva (z.B. Etanercept, Certolizumab oder Natalizumab) als potenzielle Therapeutika bei der CED diskutiert (164,166).

Tab. 2-3: Auswahl von Substanzgruppen, die zur Therapie von CU und MC eingesetzt werden, mit Beispielen für Wirkstoffe und häufig auftretende Nebenwirkungen

Substanzgruppe	Wirkstoffe (Bsp.)	Beispiele für mögliche Nebenwirkungen
<u>Antiphlogistika</u>		
Systemische Glukokortikoide	Prednisolon Prednison Methylprednisolon	· iatrogenes Cushing-Syndrom · erhöhtes Infektionsrisiko · psychische Veränderungen
Topische Glukokortikoide	Budesonid Betamethason Hydrocortison	· weniger stark ausgeprägte UAW als bei systemischer Gabe (siehe oben)
Aminosalicylate	Sulfasalazin Mesalazin Olsalazin Balsalazid	· allergische Reaktionen · Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Hautausschlag → Dosisabhängigkeit, UAW besonders ausgeprägt bei Sulfasalazin
<u>Immunsuppressiva</u>		Allgemeine UAW: · erhöhtes Infektionsrisiko · Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö
Antimetabolite	Azathioprin 6-Mercaptopurin Methotrexat	· Stomatitis, Pankreatitis · Leukopenie, Agranulozytose
Calcineurinhemmer	Ciclosporin Tacrolimus	· Nephro- und Neurotoxizität
Alkylantien	Cyclophosphamid	· erhöhtes Risiko für Neoplasien
Antikörper	Infliximab Adalimumab	· erhöhtes Risiko für Neoplasien · Gefahr schwerer Infektionen (Todesfolge)
Sonstige	Mycophenolatmofetil	· Anämie, Leuko- oder Thrombozytopenie · Magen-Darm-Blutungen, Perforation

Ein weiterer neuer Aspekt der Therapie von CU und MC ist die Gabe von Probiotika (ausgewählte apathogene Bakterien) bzw. von Präbiotika (spezielle Oligosaccharide), deren Wirkung in zahlreichen Studien untersucht wurde (13,17).

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem probiotischen *E. coli*-Stamm Nissle 1917 (Mutaflor®) eine Remissionserhaltung bei CU erreicht werden kann, die genauso effektiv ist wie die durch die Gabe von Mesalazin (167,168). Auch für *Laktobazillen* und *Bifidobakterien* konnten positive Effekte beobachtet werden (169,170). Die diskutierten Wirkmechanismen von Probiotika sind die Beeinflussung der Mikroflora, eine lokale und systemische Immunmodulation sowie eine Stärkung der Barrierefunktion des Darmepithels (171-174). Die Wirkung von Präbiotika (z.B. Inulin) ist dagegen noch nicht so intensiv untersucht worden, aber in ersten Studien konnten auch hier positive Ergebnisse erzielt werden (175,176).

Zur Therapie der CED werden auch verschiedene Antibiotika wie Metronidazol oder Ciprofloxacin eingesetzt, da im Krankheitsverlauf eine erhöhte Anzahl von pathogenen Bakterien auftritt (14). Insbesondere in der Langzeittherapie ist die Gabe von Antibiotika teilweise sehr erfolgreich, aber aufgrund der systemischen Nebenwirkungen ist ihr Einsatz bei der CED eher kritisch zu betrachten (177,178).

Für die Behandlung von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn stehen zahlreiche Therapiekonzepte zur Verfügung, die individuell für den Patienten nach den entsprechenden Leitlinien ausgewählt werden müssen. Als problematisch zu beurteilen sind jedoch die teilweise auftretenden starken Nebenwirkungen der eingesetzten Wirkstoffe.

2.3.4 Experimentell induzierte Colitis im Tiermodell

Ein wichtiger Schritt für die Aufklärung der Pathogenese der CED sowie für die Beurteilung von entsprechenden Therapeutika war die Etablierung von Colitis-Tiermodellen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Tiermodelle vorgestellt, von denen jedoch keines den MC oder die CU im Detail beschreibt (179-181).

Um den Einfluss von Siliconölemulsionen auf den Verlauf einer Colitis experimentell untersuchen zu können, war es im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung eine geeignete Form der Colitis-Induktion wie auch der Siliconöl-Applikation zu finden. Dazu wurden zwei etablierte Mausmodelle für die Induktion einer Colitis ausgewählt, das DSS- bzw. das TNBS-Modell, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.3.4.1 DSS-Colitis

Die kontinuierliche Gabe von Natrium-Dextransulfat (DSS) über das Trinkwasser führt bei Mäusen, Ratten und Hamstern zur Ausbildung einer chemisch induzierten akuten oder chronischen Colitis. Die Dosierung des DSS sowie die Dauer der Behandlung sind abhängig von der verwendeten Tierart bzw. dem Stamm und beeinflussen den Verlauf der Erkrankung.

Die akute DSS-Colitis ist vermutlich auf einen toxischen Effekt des Natrium-Dextransulfats am Darmepithel mit nachfolgender Entzündung und Zerstörung der Mukosa zurückzuführen (182). Es wird eine direkte cytotoxische Wirkung des DSS an den Epithelzellen sowie eine Störung der Interaktion zwischen intestinalen Lymphozyten, Epithelzellen und der extrazellulären Matrix infolge der DSS-Applikation diskutiert (183). Mäuse, die eine akute Colitis entwickeln, weisen Durchfall, rektale Blutungen und einen deutlichen Gewichtsverlust auf (182,184). Die Sterblichkeit der Tiere ist jedoch vergleichsweise gering. Histologisch ist die DSS-Colitis durch die Infiltration von Entzündungszellen in die Lamina propria mit fokaler Kryptenzerstörung, lymphoider Hyperplasie und epithelialer Ulzeration gekennzeichnet. Außerdem wird eine Verkürzung des Dickdarms sowie ein vermehrtes Auftreten bestimmter Bakterien (*Clostridium* spp., *Bacteroides*-Arten) beobachtet. Es konnte gezeigt

werden, dass durch die Vorbehandlung der Tiere mit Antibiotika die induzierte Colitis abgeschwächt werden kann (185).

Das DSS-Colitis-Modell ist aufgrund seiner guten Reproduzierbarkeit und einfachen Durchführung ein häufig eingesetztes Modell für die Erforschung intestinaler Entzündungsprozesse. Es ist besonders gut geeignet zur Beurteilung verschiedener Therapeutika, zur Aufklärung der Mechanismen der Epithelregeneration sowie für genetische Untersuchungen (186-189).

2.3.4.2 *TNBS-Colitis*

Ein weiteres einfaches und gut reproduzierbares Colitis-Modell ist die intrarektale Applikation von in Ethanol (30-50 %) gelöster 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) (179). Die Trinitrophenylgruppe der TNBS wirkt als Hapten und induziert in geeigneten Maus- oder Rattenstämmen eine T-Zell-vermittelte Immunantwort mit einer transmuralen Entzündung des Darms (180,189,190). Das eingesetzte Ethanol bewirkt eine Schädigung bzw. Zerstörung der Mukosa (Barrierebrecher) und ermöglicht somit eine verbesserte Penetration des TNBS in tiefere Darmschichten. Durch die Schädigung der intestinalen Barriere kommt es zu einer vermehrten Invasion von Bakterien (185). Auch hier konnte beobachtet werden, dass durch die Vorbehandlung der Tiere mit Antibiotika die Entzündungsreaktion abgeschwächt werden kann.

Ob sich eine akute, chronische oder letale Colitis entwickelt, ist stark abhängig vom verwendeten Tierstamm, von der eingesetzten TNBS-Konzentration sowie von der Anzahl der intrarektalen Applikationen (191).

Die behandelten Tiere zeigen nach der TNBS-Gabe ein struppiges Fell, blutige Durchfälle und einen Gewichtsverlust. Histologisch sind eine Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen sowie eine Granulomformation und eine Darmwandverdickung sichtbar (180).

Das TNBS-Modell eignet sich wie auch das DSS-Modell (siehe Kapitel 2.3.4.1) sehr gut für die Untersuchung verschiedener Aspekte der intestinalen Entzündung sowie zur Beurteilung von Therapeutika (192-195).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Ölkomponenten der dispersen Phase

Siliconöle

Für die Herstellung der Siliconölemulsionen wurden sieben verschieden viskose Siliconöle (GE Bayer Silicones GmbH & Co KG, D-Leverkusen; Wacker Chemie GmbH, D-München; Caesar & Loretz GmbH, D-Hilden) eingesetzt (Tab. 3-1). Die Eigenschaften und Anwendungsgebiete der Siliconöle sind in Kapitel 2.2 ausführlich dargestellt.

Tab. 3-1: Übersicht der verwendeten Siliconöle (B: GE Bayer Silicones GmbH & Co KG, W: Wacker Chemie GmbH, C: Caesar & Loretz GmbH)

Siliconöle	Kinematische Viskosität (25°C)	Hersteller
M10	10 mm ² ·s ⁻¹	B
M50	50 mm ² ·s ⁻¹	B
M100	100 mm ² ·s ⁻¹	B, C
M350	350 mm ² ·s ⁻¹	W
M500	500 mm ² ·s ⁻¹	B, W
M1000	1000 mm ² ·s ⁻¹	B
M5000	5000 mm ² ·s ⁻¹	B

Miglyol® 812

Miglyol® 812 (Caesar & Loretz GmbH, D-Hilden) ist ein Triglyceridgemisch der gesättigten Fettsäuren Capryl- und Caprinsäure sowie geringer Mengen von Laurinsäure. Es handelt sich um ein halbsynthetisches, niedrigviskoses sowie geruch- und geschmackloses Öl, das eine gute Haltbarkeit aufweist. Aufgrund seiner guten Verträglichkeit wird es u. a. als Arzneistoffträger in Emulsionen zur parenteralen Applikation sowie als Konsistenzvermittler in Suppositorien eingesetzt (196,197).

Paraffinum perliquidum

Dünnflüssiges Paraffin (Caesar & Loretz GmbH, D-Hilden) ist eine gereinigte Mischung flüssiger gesättigter Kohlenwasserstoffe, die aus Erdöl gewonnen werden. Es besteht praktisch ausschließlich aus Alkanen und Cycloalkanen. Angewendet wird es zur Konsistenzbeeinflussung von Salbengrundlagen, in öligen Nasentropfen sowie als Ölkomponente in dermatologischen Emulsionen (196).

Raffiniertes Sojaöl

Raffiniertes Sojaöl (Caesar & Loretz GmbH, D-Hilden) wird durch Extraktion und nachfolgende Raffination aus dem Samen der Sojabohne (*Glycine soja*, *Glycine max*) gewonnen. Durch bereits nach wenigen Wochen einsetzende Oxidationsprozesse ist die Haltbarkeit des Sojaöls begrenzt. In der Pharmazie wird raffiniertes Sojaöl zur Herstellung von parenteralen Fettemulsionen und von halbfesten Zubereitungen eingesetzt (196,198).

Dynasan 114 (Herstellung der Lipidnanopartikel)

Die untersuchten Lipidnanopartikel wurden mit Dynasan 114 (Condea Chemie GmbH, D-Witten) hergestellt. Dynasan 114 ist ein Triglycerid der Myristinsäure, das bei der Tablettierung als Gleitmittel sowie als Konsistenzregulator und fettende Komponente in Pudern eingesetzt wird (197). Bei Raumtemperatur liegt das reine Dynasan 114 als Feststoff vor. Die mit Dynasan 114 formulierten Lipidnanopartikel besitzen jedoch einen flüssigen Aggregatzustand infolge der auftretenden Unterkühlung der Schmelze im kolloidalen Zustand (199).

3.1.2 Emulgatoren

Cremophor® EL

Cremophor® EL (Caesar & Loretz GmbH, D-Hilden) ist die Handelsbezeichnung für Macrogolglycerolricinoleat. Der Hauptbestandteil dieses nichtionogenen Emulgators ist ethoxyliertes Glycerolricinoleat. Weiterhin sind Macrogolricinoleat und entsprechende freie Glykole enthalten. Der HLB-Wert^a von Cremophor® EL liegt zwischen 12 und 14 (197,200).

Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)

Hydroxypropylmethylcellulose (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., J-Tokyo; Handelsname: Metolose®) ist ein Methyl- und Hydroxypropyl-substituiertes Cellulose-Derivat, das in Wasser bis zu einer Temperatur von 60°C löslich ist. Zur Stabilisierung der Emulsionen wurden zwei verschiedene Hydroxypropylmethylcellulose-Typen eingesetzt, die sich in ihrer Viskosität und ihrem Substitutionstyp unterscheiden (Tab. 3-2) (201). Der Substitutionstyp trifft eine Aussage über den Anteil an Methoxyl- und Hydroxypropylgruppen im Molekül.

^a Der HLB-Wert beschreibt das Verhältnis des hydrophilen und lipophilen Anteils von nichtionischen Tensiden (ein HLB-Wert von 1 spricht für eine lipophile Verbindung; ein HLB-Wert von 20 spricht für eine hydrophile Verbindung).

Tab. 3-2: Eigenschaften der verwendeten Hydroxypropylmethylcellulosen (HPMC; Handelsname: Metolose®) (201); im weiteren Verlauf der Arbeit als HPMC 60SH-50 bzw. HPMC 90SH-100 bezeichnet

	Metolose® 60SH-50	Metolose® 90SH-100
Viskosität [mPa·s] (2%ige Lösung, 20°C)	50	100
Substitutionstyp	2910	2208
Anteil [%]		
- OCH ₃	28-30	19-24
- OCH ₂ CH(OH)CH ₃	7-12	4-12
Substitutionsgrad - OCH ₃	1,9	1,4

Die Bezeichnung der Substitutionstypen erfolgt in Abhängigkeit von der Anzahl der funktionellen Gruppen anhand der gerundeten Mittelwerte der Grenzkonzentrationen (z.B. 28-30 % Methoxylgruppen ergibt 29 und 7-12 % Hydroxypropylgruppen ergibt 10; Substitutionstyp 2910) (202).

Lipoid S100

Das Phospholipid Lipoid S100 (Lipoid GmbH, D-Ludwigshafen) ist ein Glycerolphospholipid mit einem hohen Anteil an Phosphatidylcholin (Lecithin). Phosphatidylcholin besitzt eine hydrophile Kopfgruppe (Cholin), die über eine Phosphatgruppe mit dem Glycerolgrundgerüst verbunden ist (203). Die anderen beiden Hydroxylgruppen des Glycerols sind mit Fettsäuren verestert. Phosphatidylcholin ist ein amphoterer Molekül, da es sowohl eine anionische als auch eine kationische Gruppe enthält. Die Zusammensetzung des Lipoid S100 ist in Tab. 3-3 dargestellt.

Tab. 3-3: Zusammensetzung des verwendeten Phospholipids Lipoid S100 (Herstellerangaben)

Lipoid S100	
<i>Phospholipide (g/100 g)</i>	
Phosphatidylcholin	min. 94,0
Phosphatidylethanolamin	max. 0,1
N-Acyl-Phosphatidylethanolamin	max. 0,5
Phosphatidylinositol	max. 0,1
Lysophosphatidylcholin	max. 3,0
<i>Unpolare Lipide (g/100 g)</i>	
(Triglyceride, Freie Fettsäuren, DL- α -Tocopherol)	max. 3,0

Poloxamer 188

Das nichtionische Poloxamer 188 (Lutrol® F68; BASF, D-Ludwigshafen) ist ein Blockcopolymer bestehend aus Ethylenoxid- und Propylenoxideinheiten (mittlere Zusammensetzung PEG₍₇₅₎-PPG₍₃₀₎-PEG₍₇₅₎). Die Polyoxypropyleneinheiten in der Mitte des Moleküls bilden den

lich ihrer Partikelgröße gut reproduzierbar. Daher wurde neben den reinen Emulgatoren die Emulgatormischung mit einem HLB-Wert von 8,5 (HLB 8,5) eingesetzt.

Die Zusammensetzung der Emulgatormischung mit definiertem HLB-Wert wurde aus dem HLB-Wert von Tween® 80 (HLB 15) (206) und Span® 80 (HLB 4,3) (207) unter Anwendung der Formeln (F1) und (F2) berechnet (27). Die Emulgatormischung mit einem HLB-Wert von 8,5 setzt sich somit aus 39,3 % Tween® 80 und 60,7 % Span® 80 zusammen.

$$\text{Tween}^{\circledR} 80 [\%] = \frac{100 \cdot (\text{HLB}_{\text{Mischung}} - \text{HLB}_{\text{Span}^{\circledR} 80})}{\text{HLB}_{\text{Tween}^{\circledR} 80} - \text{HLB}_{\text{Span}^{\circledR} 80}} \quad (\text{F } 1)$$

$$\text{Span}^{\circledR} 80 [\%] = 100 \% - \text{Tween}^{\circledR} 80 [\%] \quad (\text{F } 2)$$

Saccharoseester

Ryoto® Sugar Ester (Mitsubishi-Kagaku Foods Co., J-Tokyo) sind Mischungen aus Mono-, Di-, Tri- oder Polyestern, die aus Saccharose und verschiedenen Fettsäuren aufgebaut sind. Die unterschiedliche Anzahl der veresterten Hydroxylgruppen der Saccharose sowie der Einsatz verschiedener Fettsäuren führt dazu, dass diese nichtionischen Tenside einen weiten HLB-Bereich (1-16) abdecken (208).

Die Zusammensetzung und die HLB-Werte der zur Stabilisierung der O/W-Emulsionen eingesetzten Zuckerester sind in Tab. 3-4 spezifiziert.

Tab. 3-4: Zusammensetzung und HLB-Werte der verwendeten Ryoto® Sugar Ester (208)

Ryoto® Sugar Ester	Reinheit der eingesetzten Fettsäure	Esterzusammensetzung (%)		HLB-Wert
		Monoester	Di-, Tri- und Polyester	
L-595	95 % Laurinsäure	30 %	70 %	5
M-1695	95 % Myristinsäure	80 %	20 %	16
O-170	70 % Ölsäure	Keine Angaben		1
O-1570	70 % Ölsäure	70 %	30 %	15
S-570	70 % Stearinsäure	30 %	70 %	5
S-1570	70 % Stearinsäure	70 %	30 %	15

Tyloxapol

Tyloxapol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim) ist ein nichtionogenes, polymeres Tensid des Alkylaryl-Polyether-Alkohol-Typs, das für die Herstellung der Lipidnanopartikel eingesetzt wurde (209).

3.1.3 Verwendete Mikroorganismen

Die antimikrobielle Aktivität der Siliconölemulsionen wurde mit den in Tab. 3-5 aufgeführten Mikroorganismen untersucht.

Tab. 3-5: Übersicht der Mikroorganismen (G+ grampositive Bakterien; G- gramnegative Bakterien)

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> 2332	G-	Institut für Medizin. Mikrobiologie Universitätsklinikum Jena
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	G+	HS System- u. Prozesstechnik GmbH, D-Kelkheim
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	G-	
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Schimmelpilz	DSMZ GmbH, D-Braunschweig
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Hefepilz	HS System- u. Prozesstechnik GmbH, D-Kelkheim

3.1.4 Nährmedien und Lösungen für die mikrobiologischen Untersuchungen

Agarplatten und flüssige Nährmedien

Die verwendeten Agarplatten wie auch die flüssigen Nährmedien (Tab. 3-6) wurden von den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena, nach Angaben des Herstellers angefertigt und autoklaviert. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte bis einen Tag vor der Durchführung des Versuches im Kühlraum bei 4°C. Anschließend wurden sie bis zum Versuchstart bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Tab. 3-6: Übersicht der verwendeten Nährmedien

Nährmedium	Bezeichnung	Hersteller
<u>Bakterien</u>		
Agarplatten	Columbia Agar Base	Oxoid GmbH Deutschland, D-Welsen
Flüssiges Nährmedium	Brain Heart Infusion	Oxoid GmbH Deutschland, D-Welsen
<u>Pilze</u>		
Agarplatten	Sabouraud Chloramphenicol Agar	Biomérieux Deutschland GmbH, D-Nürtingen
Flüssiges Nährmedium	Sabouraud Medium	SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, D-Berlin

*Natriumchlorid/Polysorbat 80-Lösung*Rezeptur für 1000 ml Ansatz:

Polysorbat 80	0,5 g
Natriumchlorid	9,0 g
Gereinigtes Wasser	ad 1000 ml

Die Lösung wurde nach den Angaben des europäischen Arzneibuchs (210) hergestellt und anschließend 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

*Gepufferte Natriumchloridlösung*Rezeptur für 1000 ml Ansatz:

Natriumchlorid	8,10 g
Dinatriumhydrogenphosphat · 2 H ₂ O	2,28 g
Natriumdihydrogenphosphat · H ₂ O	0,30 g
Gereinigtes Wasser	ad 1000 ml

Die Lösung wurde nach der Herstellung 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für die Verdünnung der Bakterien- und Pilzsuspensionen wurden anschließend je 4,5 ml der sterilen Lösung in sterilisierte Reagenzgläser abgefüllt.

3.1.5 Phosphatpuffer und weitere Lösungen

Phosphatpuffer

In Tab. 3-7 ist die Zusammensetzung der verwendeten Phosphatpuffer aufgeführt. Der pH-Wert der Phosphatpuffer wurde mit 0,5 M NaOH bzw. verdünnter Phosphorsäure eingestellt.

Tab. 3-7: Zusammensetzung der verwendeten Phosphatpuffer

Puffer	Zusammensetzung
Phosphatpuffer pH 2,0	10 mM KH_2PO_4
Phosphatpuffer pH 2,5	10 mM KH_2PO_4
Phosphatpuffer pH 3,0	10 mM KH_2PO_4
Phosphatpuffer pH 3,5	10 mM KH_2PO_4
Phosphatpuffer pH 4,0	10 mM KH_2PO_4
Phosphatpuffer pH 4,5	10 mM KH_2PO_4
Phosphatpuffer pH 5,0	9,94 mM KH_2PO_4 0,06 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Phosphatpuffer pH 6,0	9,41 mM KH_2PO_4 0,59 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Phosphatpuffer pH 7,4	3,87 mM KH_2PO_4 6,13 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
Phosphatpuffer pH 7,4 + NaCl/KCl	136,89 mM NaCl 2,68 mM KCl 8,09 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,47 mM KH_2PO_4
Phosphatpuffer pH 9,0	0,16 mM KH_2PO_4 9,84 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Künstlicher Magensaft (ohne Pepsin)

Rezeptur für 1000 ml Ansatz (211)

Natriumchlorid	2,0 g
1 M HCl	80 ml
Gereinigtes Wasser	ad 1000 ml

3.1.6 Weitere Stoffe

Alle weiteren eingesetzten Stoffe sind in Tab. 3-8 zusammengefasst.

Tab. 3-8: Übersicht der verwendeten Stoffe; * Zusammensetzung der kommerziellen Emulsionen siehe Anhang A2, Tab. A2-1

Bezeichnung	Hersteller
1-Propanol	Merck KGaA, D-Darmstadt
2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure-Lösung 5 % (m/v)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
Dextransulfat-Natrium (DSS)	AppliChem GmbH, D-Darmstadt
Diethylether	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Elugan [®] Tropfen *	Nordmark Arzneimittel GmbH & Co. KG, D-Uetersen
Espumisan [®] Emulsion *	Berlin-Chemie AG, D-Berlin
Essigsäure (wasserfrei)	Merck KGaA, D-Darmstadt
Essigsäuremethylester	Merck Schuchardt OHG, D-Hohenbrunn
Ethanol 96 %	Mallinckrodt Baker B.V., D-Griesheim
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, D-Darmstadt
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck KGaA, D-Darmstadt
Lefax [®] Pump-Liquid *	Bayer Vital GmbH, D-Leverkusen
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
n-Hexan	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
Phosphorsäure 85 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-Steinheim
Polyethylenglykol 1000	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Polyethylenglykol 400	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Polyethylenglykol 4000	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Sab Simplex ^{®*}	Pfizer Pharma GmbH, D-Berlin
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-Karlsruhe
Salzsäure 36 %	Merck KGaA, D-Darmstadt
Silfar [®] SE 4 *	Wacker Chemie GmbH, D-München

3.2 Herstellungsmethoden für die Emulsionen und Lipidnanopartikel

3.2.1 Hochdruckhomogenisation

Emulsionen

Die Herstellung der Emulsionen erfolgte in zwei Schritten. Der zur Stabilisierung eingesetzte Emulgator wurde zunächst in der wässrigen Phase gelöst bzw. dispergiert (Ausnahme: Span® 80 Dispergierung in der Ölphase). Anschließend wurden die wässrige und die ölige Phase vereinigt und mittels Ultra-Turrax® T8 (IKA® Werke GmbH & CO.KG, D-Staufen; Dispergierwerkzeug S8N-8G) 5 Minuten (Stufe 4-5; 17000-21000 min⁻¹) zu einer grobdispersen Voremulsion verarbeitet. Der Ultra-Turrax ist eine Zahnkranzdispergiermaschine, die nach dem Rotor-Stator-Prinzip arbeitet (212).

Im nächsten Schritt wurde die erhaltene Voremulsion durch Einsatz der Hochdruckhomogenisation bei Raumtemperatur weiter zerkleinert. Der verwendete MicronLab 40 Homogenisator (APV-Gaulin, D-Lübeck) arbeitet diskontinuierlich nach dem Kolben-Spalt-Prinzip. Die Rohemulsion wird mit hohem Druck (100-1600 bar) durch einen engen Ringspalt gepresst. Die dabei entstehenden Scher- und Kavitationskräfte sowie die Kollision der Partikel sind für die weitere Zerkleinerung der Emulsionstropfen verantwortlich (26,213).

Die Rezepturen der Emulsionen sowie die Homogenisationsbedingungen variierten und werden zu Beginn der entsprechenden Abschnitte vorgestellt. Falls nicht anders angegeben, sind die Prozentangaben m/m-Prozente und beziehen sich auf den Herstellungsansatz. Die Emulsionen wurden nach der Herstellung in Vials abgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Eine Konservierung der Emulsionen erfolgte nicht, da mit diesen mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt werden sollten.

Lipidnanopartikel

Die Herstellung der Lipidnanopartikel (Rezeptur s. Kapitel 4.2.2) erfolgte nach einem ähnlichen Prinzip wie die Formulierung der Emulsionen. Der verwendete Emulgator Tyloxapol wurde in der wässrigen Phase bei Raumtemperatur gelöst. Anschließend wurde die Mischung im Wasserbad auf 80°C temperiert. Nach dem vollständigen Schmelzen des Lipids Dynasan 114 bei 80°C wurde die stabilisatorhaltige wässrige Phase zugesetzt und die innere sowie die äußere Phase mittels Ultraschall (Soniprep 150, MSE Scientific Instruments, UK-Crawley) bei 80°C vordispersiert. Die so erhaltene Rohdispersion wurde in den auf 80°C temperierten Hochdruckhomogenisator MicronLab 40 überführt und diskontinuierlich mit 5 Zyklen bei einem Druck von 800 bar homogenisiert. Die erhaltenen Proben wurden in Vials abgefüllt und in einem Klimaschrank bei 23°C gelagert.

3.2.2 Autoklavieren der Emulsionen

Ein Teil der Proben wurde nach der Herstellung 20 Minuten (inkl. Ausgleichszeit) bei 121°C und 2 bar in einem Autoklaven (Varioklav Typ 500, H+P Labortechnik GmbH, D-München) sterilisiert.

3.3 Physikochemische Methoden

3.3.1 Teilchengrößenanalyse

3.3.1.1 *Laserdiffraktometrie mit PIDS-Technologie*

Die Charakterisierung der hergestellten Emulsionen hinsichtlich ihrer Partikelgröße erfolgte mit einem LS 230 Particle Sizer (Small Volume Modul, Beckman-Coulter GmbH, D-Krefeld).

Die Grundlage der Laserdiffraktometrie ist die Lichtbeugung. Abhängig von der Form und Größe des Teilchens, an dem das Licht (Laser $\lambda=750$ nm) gebeugt wird, entstehen unterschiedliche Beugungsbilder, deren Auswertung mit verschiedenen optischen Theorien möglich ist. Die Kombination der Laserdiffraktometrie mit der PIDS-Technologie (Polarization Intensity Differential Scattering-Technologie) ermöglicht die Messung von breit verteilten Proben mit Partikeln im Größenbereich von 40 nm bis 2000 μm . Das Prinzip der PIDS-Technologie ist die Bestrahlung der zu untersuchenden Probe mit horizontal und vertikal polarisiertem Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Anschließend wird die Streulichtintensität unter sechs verschiedenen Winkeln analysiert (214-216).

Die Berechnung der Partikelgrößenverteilung aus den Rohdaten erfolgte unter Anwendung der Mie-Theorie sowie unter Annahme einer sphärischen Gestalt der Partikel. Für die Siliconölemulsionen wurde ein realer Brechungsindex der Partikel von 1,40 (47) zur Berechnung eingesetzt. Die realen Brechungsindizes für die Partikel der Emulsionen, die mit den anderen pharmazeutischen Ölen hergestellt wurden, wurden für Paraffinöl mit 1,48 (217), für Sojaöl mit 1,47 (218) bzw. für Miglyol® 812 mit 1,45 (219) angenommen. Die zu charakterisierenden Proben wurden für die Messung mit entmineralisiertem Wasser verdünnt. Es wurden jeweils 6-8 Messungen über einen Zeitraum von je 90 Sekunden durchgeführt, deren Werte anschließend gemittelt wurden.

Als Messparameter der volumenbezogenen Verteilung wurden zur Auswertung der Mean (arithmetisches Mittel), der Median (D50-Wert, Zentralwert) sowie der D99-Wert (Durchmesser bei 99 % der Durchgangssumme) herangezogen.

3.3.1.2 *Single Particle Optical Sensing (SPOS)*

Ausgewählte Emulsionen wurden zusätzlich hinsichtlich ihrer Partikelgrößenverteilungen mit dem AccuSizer 780/SIS (PSS Particle Sizing Systems, USA-Santa Barbara), einem optischen Einzelpartikelanalysegerät, charakterisiert. Dieses System ist besonders gut für die Detektion von Partikeln im Mikrometer-Bereich geeignet (220,221).

Die zu untersuchenden Partikel fließen hierbei in flüssigem Medium durch eine Kapillare, die mit einer Laserdiode durchstrahlt wird. Jeder Partikel, der den Sensorstrom passiert, kann dabei einzeln detektiert werden. Die Partikel-Licht-Interaktion kann einerseits nur durch die entstehende Lichtblo-

ckade oder durch die Kombination der Lichtblockade mit der Lichtstreuung bestimmt werden, womit es möglich ist, Partikel in einem Messbereich von 0,5 μm bis 400 μm zu untersuchen (222-224).

Die Partikelgrößenanalyse der Emulsionen wurde in entmineralisiertem und filtriertem (0,2 μm Membranfilter, B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen) Wasser durchgeführt, das vor jeder Messung mittels einer Vakuumpumpe (Typ: RD-4, Brand GmbH + Co KG, D-Wertheim) 20 min bei 40 mbar entgast wurde. Als Messgefäß dienten 0,2 l Plastiktrinkbecher (PAPSTAR, D-Kall), da diese nur eine sehr geringe Partikelbelastung zeigten (225). Zunächst wurden ca. 145 ml Wasser in das Messgefäß gefüllt und entgast. Anschließend wurde der Hintergrund mit 3 x 20 ml entgastem Wasser bestimmt. Das restliche Wasser wurde gewogen und die Probe wurde in einer geeigneten Verdünnung zugesetzt, durch leichtes Schwenken gemischt und erneut wurden 3 x 20 ml Wasser mit Probe vermessen (siehe auch SOP Accusizer SIS (225)). Die richtige Konzentration der untersuchten Probe ist von großer Bedeutung. Ist die Konzentration der Partikel zu hoch, passieren mehrere Partikel gleichzeitig die Sensor-Zone und werden als ein großer Partikel detektiert. Passieren jedoch zu wenige Partikel die Kapillare, ist das Ergebnis nicht repräsentativ für die gesamte Probe. Für die Einstellung des optimalen Konzentrationsbereiches dient die Countrate, die in der Literatur mit weniger als 6000 counts/ml als geeignet angegeben wird (224). Die Messungen wurden im Summation-Mode mit einem Threshold von 0,99 μm und einer Countrate zwischen 3000 und 6000 counts/ml durchgeführt. Die Partikelanzahl pro ml Probe konnte anschließend rechnerisch ermittelt werden. Es wurden von jeder untersuchten Probe mindestens 3 Messungen durchgeführt, deren Ergebnisse anschließend gemittelt wurden.

3.3.1.3 *Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)*

Die mittlere Größe der Lipidnanopartikel wurde mit einem Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600; Malvern Instruments GmbH, D-Herrenberg) bestimmt.

Die Photonenkorrelationsspektroskopie ist ein dynamisches Streulichtverfahren, mit dem auch sehr kleine Teilchen gut charakterisiert werden können. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung der Partikel kommt es zu einer zeitabhängigen Fluktuation der Streulichtintensität, die in einem Winkel von 173° mittels eines Photomultipliers detektiert wird. Die zeitliche Änderung der Intensität ist größenabhängig, da kleinere Teilchen eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit als größere Teilchen besitzen. Aus den Schwankungen der Streulichtintensität wird eine Autokorrelationsfunktion berechnet, die mit Hilfe der Kumulantenmethode ausgewertet wird (226).

Als Messergebnis wird unter der Annahme einer sphärischen Gestalt der Partikel ein intensitätsgewichteter mittlerer Teilchendurchmesser (z-Average) sowie der Polydispersitätsindex (PI) als Maß für die Breite der Verteilung angegeben. Die Messtemperatur (25°C) sowie die Viskosität (0,890 mPa·s) und der Brechungsindex (1,460) des Dispersionsmediums haben u.a. einen Einfluss auf die Berechnung der Messergebnisse.

Jede zu untersuchende Probe wurde mit demineralisiertem filtrierten (0,2 μm Membranfilter, B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen) Wasser verdünnt. Anschließend wurden von jeder Probe 4 Messungen

à 300 s durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt, wobei jedoch nur die letzten 3 Messwerte einbezogen wurden.

3.3.2 Bestimmung des Zetapotenzials

Die Bestimmung des Zetapotenzials der M500-Emulsion, die mit dem Zuckerester S570 stabilisiert wurde, erfolgte mit dem Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600; Malvern Instruments GmbH, D-Herrenberg) bei 25°C. Die Dispersion wurde hierzu mit sterilfiltrierten (0,2 µm Membranfilter, B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen) 10 mM Phosphatpuffern (verschiedene pH-Werte) bzw. Aqua dest. verdünnt und in speziellen Küvetten (DTS 1060 - Disposable Zeta Cell, Malvern Instr.) vermessen. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der DTS Dispersion Technology Software (Version 3.30 2002, Malvern Instr.) unter Anwendung des Smoluchowski-Modells. Für die Berechnung wurden eine Viskosität des Dispersionsmediums von 0,8872 mPa·s und ein Brechungsindex der dispersen Phase von 1,40 zugrunde gelegt. Es wurden jeweils 6-8 Messungen im automatischen Modus (min. 10 bzw. max. 100 Einzelmessungen) durchgeführt, deren Ergebnisse anschließend gemittelt wurden.

Außerdem wurde das Zetapotenzial ausgewählter M500-Emulsionen (mit verschiedenen Stabilisatoren) untersucht. Die Messungen wurden von Frau Marion Frant am Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V (iba), Heiligenstadt mittels eines Zetamasters (Malvern Instruments GmbH, D-Herrenberg) durchgeführt. Die Emulsionen wurden in Aqua dest. bzw. 0,001 M NaCl-Lösung je 3-mal vermessen. Von den bestimmten Zetapotenzialen für eine Probe (n=3) wurde der Mittelwert gebildet.

3.3.3 pH-Wert-Bestimmung

Für die mikrobiologischen Untersuchungen sowie für die Stabilitätsstudie im künstlichen Magensaft wurde der pH-Wert der Pufferlösungen und ausgewählter Emulsionen mit dem Microprocessor pH-Meter, pH 537 (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, D-Weilheim) mit einer BlueLine® 23 pH Glasmembran-Elektrode (Schott Instruments GmbH, D-Mainz) bestimmt.

3.3.4 Bestimmung der Osmolalität

Die Osmolalität ausgewählter Emulsionen und Lösungen wurde mit einem KNAUER Semi-Micro Osmometer (Knauer, D-Berlin) gemessen. Das Gerät wurde vor den Messungen mit entmineralisiertem Wasser (0 mOsmol/kg) und einer Natriumchlorid-Lösung (400 mOsmol/kg) kalibriert.

3.3.5 Bestimmung des Cloud Points (Trübungspunkt)

Für die Bestimmung des Cloud Points von Wacker Belsil® DMC 6031 bzw. HSY 115 wurde von den Emulgatoren je eine 1%ige (m/m) wässrige Lösung hergestellt (Durchführung der Bestimmung in Anlehnung an Jumaa et al. (227)). Anschließend wurden je 15 ml der entsprechenden Lösung in einem Glasgefäß auf einer Heizplatte erwärmt. In die Flüssigkeit wurde ein Temperaturfühler des Microprocessor pH-Meters, pH 537 (Genauigkeit 0,1°C) getaucht. Die Lösung wurde erhitzt und die Temperatur, bei der eine Trübung der Lösung einsetzte, ermittelt. Nach weiterer Erhöhung der Temperatur um ca. 3°C wurde die Lösung abgekühlt und die Temperatur notiert, bei der die Lösung wieder klar wurde. Der Mittelwert dieser beiden Temperaturen wird als Cloud Point angegeben. Für jede Probe wurden 3 Wiederholungsmessungen mit anschließender Mittelung der Messwerte durchgeführt.

3.3.6 Bestimmung der Oberflächenspannung und des Kontaktwinkels

3.3.6.1 Oberflächenspannung

Zur Bestimmung der Oberflächenspannung σ der Proben wurde die Vertikalplattenmethode nach Wilhelmy eingesetzt (DCAT 11 Tensiometer, DataPhysics Instruments GmbH, D-Filderstadt sowie Processor Tensiometer K 12, Krüss GmbH, D-Hamburg). Dabei wird ein dünnes angerauhtes Platinplättchen definierter Größe senkrecht in die Flüssigkeit eingetaucht, um seine Benetzung mit der Flüssigkeit zu gewährleisten. Anschließend wird die Unterkante des Plättchens auf die des Flüssigkeitsspiegels angehoben. Mit Hilfe eines Wägesystems wird nun die nach unten gerichtete Kraft F_0 (F_3) gemessen. Die Plattenmethode ist ein statisches Verfahren (228,229). Die Oberflächenspannung ergibt sich aus:

$$\sigma = F_{\sigma} / (l \cdot \cos \theta) \quad (\text{F } 3)$$

l - benetzte Länge (Umfang) des Plättchens
 θ - Kontaktwinkel

Es wurden pro Probe mindestens 3 Messungen ($n=3-6$) bei Raumtemperatur ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durchgeführt. Die Messergebnisse wurden anschließend gemittelt. Zur Kontrolle des Messsystems wurde die Oberflächenspannung von Wasser bestimmt. Nach jeder Messung wurde das verwendete Platinplättchen zur Reinigung über der Gasflamme ausgeglüht.

3.3.6.2 Kontaktwinkel

Die Messung des Kontaktwinkels erfolgte mit einem Contact Angle System OCA (DataPhysics Instruments GmbH, D-Filderstadt). Die zu untersuchende Probe wurde automatisch mittels Hamilton-

Spritze auf die Feststoffoberfläche aufgesetzt (Volumen Flüssigkeitstropfen ca. 3 μl). Anschließend wurde kontinuierlich ein geringes Volumen der Probe zudosiert, um die Verdunstungseffekte zu kompensieren und um sicherzustellen, dass ein gleich bleibender Tropfen vermessen wird.

Für die Kontaktwinkelmessungen der Emulsionen und Lösungen wurden Borosilikat-Objektträger verwendet, die mittels eines Sol-Gel-Prozesses mit anorganischem Nanosol beschichtet wurden und hydrophobe Eigenschaften sowie eine homogene Oberfläche aufwiesen (230). Für ausgewählte Proben wurde die Bestimmung des Kontaktwinkels auf lipidierten Borosilikat-Slides wiederholt (231). Problematisch war jedoch, dass die Beschichtung der Glasoberfläche mit dem Lipid nur auf wenigen Slides zu einer homogenen Oberfläche führte und somit reproduzierbare Messungen nur auf wenigen lipidierten Objektträgern möglich waren.

Der auf die Feststoffoberfläche aufgesetzte Flüssigkeitstropfen wurde videogestützt dargestellt (Abb. 3-2, *links*). Der Kontaktwinkel wurde durch das Anlegen einer Tangente in dem Punkt, in dem der Flüssigkeitstropfen die Festkörperoberfläche sowie den Gasraum (Luft) berührt, berechnet.

Für jeden Flüssigkeitstropfen wurden ca. 200-500 Kontaktwinkelwerte gemessen. Bis zum Aufbau eines konstanten Tropfens konnte ein leichter Anstieg der Kontaktwinkelwerte beobachtet werden. Anschließend schwankten die Messwerte nur gering um einen Plateauwert. Bei weiterer Zunahme des Tropfenvolumens kam es zu einer Abnahme des Kontaktwinkels der Probe. In die Auswertung wurden 150 Messwerte aus dem Plateaubereich einbezogen (Abb. 3-2, *rechts*).

Es wurden für jede Probe 3 oder 4 Messungen durchgeführt. Die experimentell bestimmten Kontaktwinkelwerte wurden gemittelt und die entsprechende Standardabweichung berechnet (siehe Kapitel 3.3.6.3 *Statistische Auswertung*).

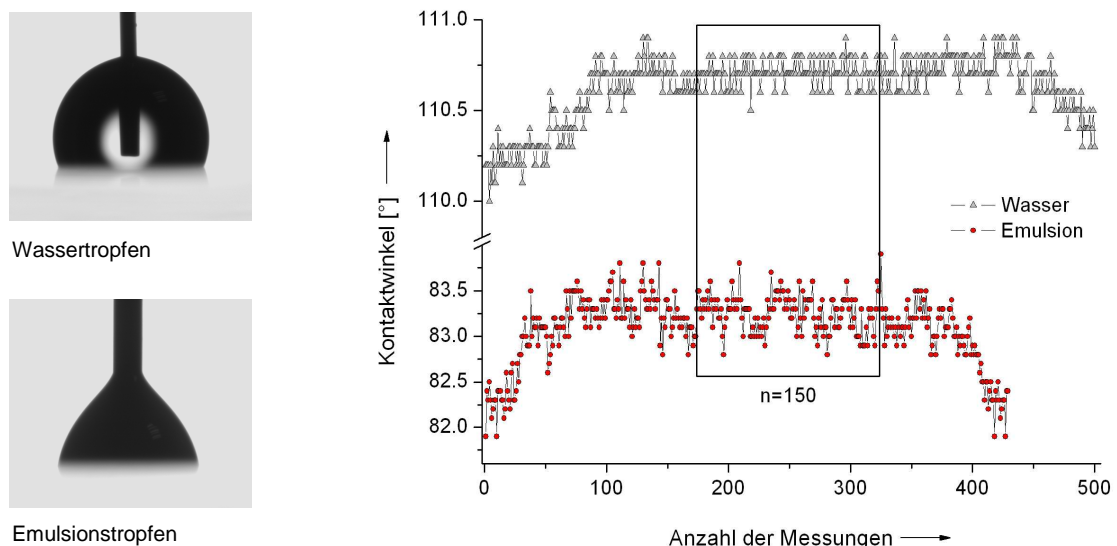


Abb. 3-2: *links:* Videogestützte Darstellung eines Wasser- (oben) bzw. eines Emulsionstropfens (unten); *rechts:* Verlauf der Kontaktwinkelwerte während der Messung von Wasser bzw. einer M500-Siliconölemulsion auf beschichtetem Borosilikatglas

3.3.6.3 Statistische Auswertung

Die Oberflächenspannung bzw. der Kontaktwinkel wurde für jede Probe mehrfach ($n=3-6$) bestimmt. Anschließend wurden die Messergebnisse einer Probe gemittelt (F 4). Der nach einer Messung angegebene Messwert ist jedoch bereits ein Mittelwert aus $n_e=50$ (Oberflächenspannung) bzw. $n_e=150$ (Kontaktwinkel) Einzelmesswerten. Um die Standardabweichung der Messungen korrekt zu bestimmen, wurde zunächst die Varianz (F 5) von jeder Messung berechnet (Einzelmesswerte $n_e=50$ bzw. $n_e=150$), um anschließend die Intravarianz (F 6) zwischen den 3-6 Messwerten (Wiederholungsmessung) einer Probe zu ermitteln. Durch Subtraktion der Intravarianz von der Varianz der Messwerte der Proben wurde die Intervarianz (F 7) und im Folgenden die Interstandardabweichung (F 8) bestimmt. Die im weiteren Verlauf dargestellten Werte der Oberflächenspannung und des Kontaktwinkels sind Mittelwerte aus 3-6 Messungen mit Angabe der Interstandardabweichung (s_{inter}).

Die Signifikanzprüfung der Messwerte wurde mittels eines unabhängigen, zweiseitigen T-Tests mit Hilfe des Programms SPSS 15.0 durchgeführt. Der Unterschied der Proben wurde als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner oder gleich dem Signifikanzniveau $p=0,05$ war.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{F 4})$$

$$\sigma = \frac{1}{n_e - 1} \sum_{i=1}^{n_e} (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{F 5})$$

$$\sigma_{\text{intra}} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \sigma \quad (\text{F 6})$$

$$\sigma_{\text{inter}} = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (\bar{x}_i - \bar{x}_{\text{ges}})^2 - \frac{1}{n_e} \cdot \sigma_{\text{intra}} \quad (\text{F 7})$$

$$s_{\text{inter}} = \sqrt{\sigma_{\text{inter}}} \quad (\text{F 8})$$

\bar{x} Mittelwert

n Anzahl der Messungen

n_e Anzahl der Einzelmessungen ($n_e=50$ bzw. 150)

x_i Messwert

σ Varianz

σ_{intra} Intravarianz

σ_{inter} Intervarianz

s_{inter} Interstandardabweichung

3.3.7 Kapillarviskosimetrie

Die Viskosität der wässrigen Lösungen wurde mit dem automatischen Messgerät AVS 3650 (Schott-Geräte GmbH, D-Hofheim), das mit der Temperiereinheit CT 1450/CK 101 kombiniert wurde, bestimmt. Für die Messung der Proben bei 20°C und 25°C wurden verschiedene Ubbelohde-Kapillarviskosimeter verwendet (Tab. 3-9).

Tab. 3-9: Übersicht der eingesetzten Ubbelohde-Kapillarviskosimeter (Kapillartyp, Einteilung nach Ph. Eur., Apparatenummer, Kapillarkonstante)

Kapillartyp	nach Ph. Eur.	App.-Nummer	Konstante [mm ² ·s ⁻²]
53200	0	97953	0,001038
53201	0a	91414	0,004872
53213	Ic	96276	0,02933
53213	Ic	96277	0,2910
53710	I	1008446	0,009970

Die Kapillarviskosimeter wurden vor jeder Messung mit Ethanol gespült und anschließend mittels Druckluft getrocknet. Die kinematische Viskosität der Proben wurde aus der gemessenen Durchflusszeit eines definierten Probenvolumens durch die Kapillare berechnet.

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe der Software VPC 38. Durch die Multiplikation der kinematischen Viskosität der Lösungen mit deren Dichte wurde die dynamische Viskosität ermittelt (F 9). Für jede Probe wurden 3-5 Messungen durchgeführt.

$$\eta = \nu \cdot \rho \quad (\text{F } 9)$$

η	dynamische Viskosität	[mPa·s]
ν	kinematische Viskosität	[mm ² ·s ⁻²]
ρ	Dichte	[g·cm ⁻³]

3.3.8 Dichtebestimmung

Zur Bestimmung der Dichte der wässrigen Lösungen wurde der Biegeschwinger DMA 38 mit integriertem Thermostaten (Anton Paar GmbH, D-Ostfildern) verwendet.

Die zu untersuchende Probe wurde mittels einer Spritze luftblasenfrei in ein U-förmig gebogenes, gläsernes Rohr eingefüllt, welches dann auf elektronischem Wege in eine ungedämpfte Schwingung versetzt wurde. Die Kalibrierung des Biegeschwingers erfolgte für jede Temperatur mit bidestilliertem Wasser und Luft. Die Dichte der Proben wurde aus der Eigenfrequenz des Biegeschwingers, die abhängig ist von der Masse der Probe, berechnet.

Die Messung der Dichte der Proben bei 20°C und 25°C wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

3.3.9 Mikro-Raman-Spektroskopie

Im Rahmen der Untersuchungen zur Stabilität der Emulsionen im künstlichen Magensaft wurde an ausgewählten Proben Mikro-Raman-Spektroskopie durchgeführt (232,233).

Die Raman-Spektroskopie ist eine Schwingungsspektroskopie, die darauf beruht, dass in einem nicht-linearen Molekül $3N-6$ (N -Anzahl der Atome im Molekül) Eigenschwingungen vorhanden sind. Eine Eigenschwingung kann nur durch die Aufnahme eines definierten und für jede einzelne Schwingung typischen Energiebetrags ein höheres Schwingungsniveau erreichen (Schwingungsfrequenz bleibt konstant, aber Amplitude und damit die Geschwindigkeit vergrößern sich). Da sich die Eigenschwingungen und die dazugehörigen Energiebeträge jedes chemisch verschiedenen Moleküls unterscheiden, unterscheiden sich auch die entsprechenden Schwingungsspektren, was eine Differenzierung von Substanzen ermöglicht (vgl. molekularer Fingerabdruck). Der Energieeintrag erfolgt im Falle der Raman-Spektroskopie über inelastische Lichtstreuung.

Vorteilhaft bei der Detektion von Raman-Spektren sind unter anderem die unkomplizierte Probenvorbereitung, das geringe Probenvolumen und das zerstörungsfreie Messen.

In dieser Arbeit wurden wahlweise ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (532 nm) oder ein He-Ne-Laser (633 nm) als Anregungsquelle eingesetzt. Das Laserlicht wurde über ein inverses Mikroskop (Olympus IX70; Olympus Deutschland GmbH, D-Hamburg) durch ein Objektiv (10x, 50x oder 100x) auf die Probe fokussiert (minimaler Laser-Spot-Durchmesser von ca. 0,7 μm). Die untersuchten Feststoffe wurden mittels doppelseitigem Tesafilm auf einem Objektträger fixiert, während flüssige Proben zwischen einem Deckgläschen und einem Objektträger gehalten wurden. Ein Teil (begrenzt durch die numerische Apertur des Objektivs) des gestreuten Laserlichts wurde in 180°-Rückstreugeometrie in ein dispersives LabRam HR Spektrometer (HORIBA Jobin Yvon GmbH, D-Bensheim) gelenkt (Eingangsspalt: 100 μm , Gitter: 300 oder 1800 Linien/mm, Brennweite: 800 mm). Als Detektor fungierte eine CCD-Kamera (1024x512 Pixel). Der Aufbau ist detailliert in der Literatur beschrieben (234).

3.3.10 Dünnschichtchromatographie

Zur Durchführung der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen (in Anlehnung an die Methode von Yao et al. (235)) wurden 10x10 cm Hochleistungsdünnschichtplatten (Nano-SILGUR-20, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, D-Düren) mit einer Kombinationsschicht aus Kieselgur (Auftrags- und Vorkonzentrierungsschicht) und Nanokieselgel 60 (Trennzone) verwendet.

Die Dünnschichtplatten wurden zunächst einer Vorentwicklung mit Laufmittel A (Tab. 3-10) unterzogen. Anschließend wurde die Platte für 10 min auf 110°C erhitzt und somit aktiviert. Die zu untersuchenden Proben wurden in einer Chloroform-Methanol-Mischung (1:2 V/V) gelöst und mit einer Mikroliterspritze (2 μl , Hamilton) punktförmig auf die aktivierte Dünnschichtplatte aufgetragen (9 Proben pro Platte). Die Platte wurde mehrfach entwickelt, um Lipide mit unterschiedlichen Polaritäten zu trennen. Die dazu verwendeten Laufmittel sind in Tab. 3-10 zusammengefasst.

Tab. 3-10: Zusammensetzung und Funktion der Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie

Laufmittel	Funktion	Zusammensetzung (V/V)
A	Auftrennung polarer Lipide (z.B. Phospholipide, Mono- und Diglyceride)	26,6 Teile Methylacetat
		26,6 Teile 1-Propanol
		26,6 Teile Chloroform
		10,6 Teile Methanol
		9,6 Teile Kaliumchlorid-Lösung 0,25 % (m/V)
B	Auftrennung apolarer Lipide (z.B. Triglyceride und Cholesterolester)	75,0 Teile n-Hexan
		23,0 Teile Diethylether
		2,0 Teile Essigsäure
C	Verbesserung des Trennergebnisses	100,0 Teile n-Hexan

Zunächst wurde die Platte in Laufmittel A bis 4,6 cm über der Vorkonzentrierungszone und anschließend in Laufmittel B und C bis zum oberen Rand entwickelt. Zwischen den verschiedenen Entwicklungsschritten wurde die Platte sorgfältig mittels Heißluftgebläse getrocknet.

Die Detektion der Lipidbanden erfolgte durch kurzes Eintauchen in eine Färbelösung (75 g Kupfersulfat·5H₂O, 100 ml Phosphorsäure 85 %, 900 ml gereinigtes Wasser). Nach dem Abtropfen des überschüssigen Reagenz wurde die Platte im Heißluftschrank 5-8 min bei 170°C erhitzt. Die Identifizierung der Lipidbanden wurde nur qualitativ durch den Vergleich mit den aufgetragenen Referenzsubstanzen durchgeführt.

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Anzucht der Testorganismen und Herstellung des Inokulums

Staphylococcus aureus (ATCC 6538) und *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

Der Promedicontrol® KwikStik wurde unter der LAF-Bank (Laminar Air Flow) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Nach der Hydratisierung und somit Aktivierung der lyophilisierten Mikroorganismen wurde die Bakteriensuspension mit dem Impftupfer auf eine Agarplatte nach dem 13-Strich-Verfahren (236) aufgetragen und anschließend 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Anzucht der Bakterienkultur auf der Agarplatte wurde mit einer sterilen Einwegimpfnadel eine einzelne Kolonie abgenommen, in flüssiges Nährmedium überführt und verteilt. Die Konzentration der Bakteriensuspension lag nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37°C bei 10^9 KBE/ml (Bestimmung durch Trübungsvergleich). Für die Beimpfung der Proben wurde die Bakteriensuspension (10^9 KBE/ml) mit einer 0,9%igen gepufferten Natriumchlorid-Lösung verdünnt und so auf die gewünschte Keimzahl eingestellt.

Escherichia coli (2332)

Der *Escherichia coli* Stamm 2332 wurde als Kryokultur vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena, zur Verfügung gestellt. Zur Anzucht der Bakterienkultur wurde unter der LAF-Bank ein Keramikstückchen mit einer sterilen Einwegimpföse aus den Kryoröhrchen entnommen, das anschließend auf einer Agarplatte ausgerollt wurde. Die Agarplatte wurde 24 h bei 37°C inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde der *E. coli*-Stamm wie die *S. aureus*- und *P. aeruginosa*-Kulturen behandelt (siehe oben).

Candida albicans (ATCC 10231)

Die Anzucht von *Candida albicans* unter Verwendung einer KwikStik Einheit erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie es bei *S. aureus* und *P. aeruginosa* beschrieben wurde (siehe oben). Die Agarplatten und auch das flüssige Nährmedium mit *C. albicans* wurden jedoch je 2 Tage bei 23°C inkubiert. Die Hefepilzsuspension (ca. 10^7 KBE/ml) konnte anschließend ohne weitere Verdünnung zur Beimpfung der Proben eingesetzt werden.

Aspergillus niger (ATCC 16404)

Die Sporen von *Aspergillus niger* wurden als Kryokultur vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, erhalten. Die Anzucht und Konservierung der Stammkultur wurde dort bereits von Herrn Saupe durchgeführt (237).

Mit einer sterilen Einwegimpföse wurde unter der LAF-Bank ein Keramikstückchen aus dem Kryoröhrchen entnommen und auf eine Sabouraud-Agarplatte übertragen und ausgerollt. Nach 2 Tagen Lagerung der Sabouraud-Agarplatten bei 23°C im Brutschrank war ein weißer Bewuchs der beimpften Platten erkennbar (Abb. 3-3, *links*). Eine Braun- bis Schwarzfärbung und somit eine Sporulation von *Aspergillus niger* war nach einer Woche Bebrütung zu beobachten (Abb. 3-3, *rechts*).

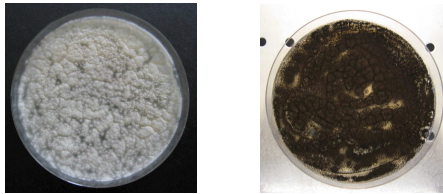


Abb. 3-3: Agarplatten mit *Aspergillus niger*
links: Agarplatte nach 2 Tagen Inkubation
rechts: Agarplatte nach 7 Tagen Inkubation (Sporulation)

Die *A. niger* Sporen wurden mit 12 ml einer NaCl-Polysorbat 80-Lösung abgelöst. Nach der Zentrifugation der Sporensuspension (15 min, 5000 rpm, Raumtemperatur) wurden 4 ml des Überstandes mit einer Kunststoffpipette abgenommen. Der Niederschlag und der verbleibende Überstand wurden wieder resuspendiert. Im Folgenden wurde eine Verdünnungsreihe mit gepufferter Natriumchlorid-Lösung hergestellt, um die Sporenkonzentration zu bestimmen.

Die Sporensuspension hatte eine Konzentration von 10^7 KBE/ml und konnte somit direkt zur Beimpfung der Proben verwendet werden.

3.4.2 Beimpfung der Proben und Bestimmung der Keimzahlreduktion

3.4.2.1 Prüfung auf ausreichende Konservierung

Die Durchführung der Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit von ausgewählten Emulsionen und Lösungen erfolgte zunächst in Anlehnung an die „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (Ph. Eur. 5.1.3) (210) mit den Mikroorganismen *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *S. aureus* (ATCC 6538), *C. albicans* (ATCC 10231) und *A. niger* (ATCC 16404).

Die Bakterien- und Pilzsuspensionen wurden, falls erforderlich, durch Verdünnung mit gepufferter NaCl-Lösung auf eine Keimdichte von 10^7 - 10^8 Mikroorganismen pro Milliliter eingestellt (siehe auch Kapitel 3.4.1). Von jeder Zubereitung wurden 2 Proben parallel untersucht. Die Mikroorganismen wurden nicht als Mischung, sondern einzeln den Proben zugesetzt.

Das Volumen der Mikroorganismus-Suspension, mit dem die entsprechende Probe beimpft werden sollte, betrug 1 Prozent des Volumens der Zubereitung. Nach Zugabe der Stammsuspension zu den Zubereitungen erfolgte nach Schütteln eine erstmalige Probenentnahme aus den beimpften Emulsionen bzw. Lösungen. Von jeder Zubereitung wurden 0,5 ml mit einer Pipette entnommen und sofort zu je 4,5 ml gepufferter NaCl-Lösung gegeben (1:10 Verdünnung). Nach dem gleichen Prinzip erfolgte die Herstellung der Verdünnungsreihen. Von ausgewählten Verdünnungen wurden 100 µl Lösung entnommen und mit einem Drigalskispatel auf einer Platte verteilt. Je nach Verdünnungsstufe wurden

Einfach- oder Doppelbestimmungen der Keimzahl durchgeführt. Die Agarplatten mit den Bakterienkulturen wurden anschließend einen Tag bei 37°C inkubiert, die Sabouraud-Agarplatten dagegen 2 Tage bei 23°C. Nach ausreichender Inkubation wurde die Anzahl der Kolonien auf den Agarplatten ermittelt und so die Zahl der KBE/ml in den untersuchten Proben bestimmt.

Die beimpften Zubereitungen wurden nach der erstmaligen Probenentnahme zur Bestimmung der Startkonzentration bei 20-25°C (klimatisierter Laborraum) unter Lichtschutz gelagert. Nach 1, 7, 14 und 28 Tagen wurde erneut die Keimzahl der Proben nach der gleichen Vorgehensweise analysiert. Abhängig von der Entwicklung der Keimzahl in den Proben wurden die entsprechenden Verdünnungen hergestellt und ausgespatelt.

Außerdem wurden von jeder Probe vor dem Zusatz der Mikroorganismus-Suspension je zweimal 100 µl entnommen und auf je 2 Agarplatten verteilt. Damit sollte eine eventuell bereits vor dem Versuchsstart vorhandene mikrobielle Kontamination der Zubereitungen ausgeschlossen werden.

3.4.2.2 *Aufbauende Studien zur antibakteriellen Aktivität*

Aufbauend auf den Ergebnissen, die bei der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ erhalten wurden (Kapitel 4.4.1), erfolgte die Durchführung weiterführender mikrobiologischer Untersuchungen. Dabei wurde hauptsächlich das gramnegative Bakterium *E. coli* 2332 eingesetzt. Aber auch andere Bakterien wie *S. aureus* (ATCC 6538) und *P. aeruginosa* (ATCC 9027) wurden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Siliconölemulsionen näher beurteilt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben. Allerdings wurde die Keimkonzentration der Bakteriensuspensionen (Startkonzentration 10^5 - 10^6 KBE/ml in den Proben) zur Animpfung der Proben variiert. Die Lagerung der Proben erfolgte außerdem nach der Probenentnahme bei 37°C. Die Keimzahl der Proben wurde nur sofort nach der Inokulation der Zubereitungen sowie nach 24 h und 7 Tagen bestimmt.

Die genauen Versuchsbedingungen sind bei der Auswertung der entsprechenden Studie kurz dargestellt (Kapitel 4.4.2).

3.4.3 Beurteilung der antimikrobiellen Aktivität

Die Beurteilung der antimikrobiellen Wirksamkeit der Zubereitungen erfolgte durch Bestimmung der Verminderung der Anzahl der vermehrungsfähigen Mikroorganismen, bezogen auf den Keimgehalt des Inokulums (Ph. Eur. 5.1.3) (210).

Von den Keimzahlen (KBE/ml) der Parallelen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Die dekadisch logarithmische Reduktion der Ausgangskeimzahl nach 1, 7, 14 bzw. 28 Tagen wurde unter Verwendung der Mittelwerte der beiden Parallelen einer Zubereitung angegeben (n=2, 3 oder 4) (F 10). Außerdem wurden die Standardabweichungen der logarithmischen Keimzahlreduktion nach dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz bestimmt (F 11).

$$f = \lg \frac{a}{b} \tag{F 10}$$

$$\Delta f = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a \cdot \ln 10}\right)^2 + \left(-\frac{\Delta b}{b \cdot \ln 10}\right)^2} \tag{F 11}$$

- a Ausgangskeimzahl (KBE/ml)
- b Keimzahl nach 1, 7, 14 bzw. 28 Tagen (KBE/ml)
- f dekadisch logarithmische Keimzahlreduktion
- Δa, Δb, Δf Fehler der jeweiligen Größe

Falls in der unverdünnten Probe keine lebensfähigen Mikroorganismen mehr vorhanden waren (0 KBE/ml), wurde zur Berechnung der logarithmischen Keimzahlreduktion ein Wert von eins eingesetzt.

Die untersuchten Zubereitungen erfüllen die Anforderungen der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ des Europäischen Arzneibuchs für Zubereitungen zum Einnehmen (210), wenn die geforderten Kriterien in Tab. 3-11 für alle 4 Mikroorganismen erfüllt werden.

Tab. 3-11: Kriterien der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ für Zubereitungen zum Einnehmen (Ph. Eur.) (210)

	log-Stufen der Keimzahlminderung	
	14 Tage	28 Tage
Bakterien	3	keine Zunahme der Keimzahl
Pilze	1	keine Zunahme der Keimzahl

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Tierversuchsgenehmigung Reg.-Nr. 02-128/08; Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz). Als Versuchstiere dienten weibliche C57BL/6 Mäuse mit einem Gewicht zwischen 20 g und 22 g (Charles River Wiga Deutschland GmbH, D-Sulzfeld). Die Haltung der Mäuse erfolgte in den Tierhaltungsräumen der Arbeitsgruppe „Pharmakologische Hämostaseologie“, Universitätsklinikum Jena, unter konventionellen Bedingungen. Die Tiere waren einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus bei 22°C und 60 % Luftfeuchtigkeit ausgesetzt und wurden frühestens 2 Wochen nach Lieferung in den Versuch aufgenommen. Bis Versuchsbeginn standen den Tieren Standardfutter (Altromin 1326, Altromin GmbH & Co. KG, D-Lage) sowie Trinkwasser ad libitum zur Verfügung.

3.5.2 DSS-induzierte Colitis

Die experimentelle Colitis im Mausmodell wurde durch den Zusatz von 2,0 % (m/V) Natrium-Dextransulfat (MW 40.000) zum Trinkwasser bzw. zu einer verdünnten Siliconölemulsion (Gruppe B1) über einen Zeitraum von 6 Tagen induziert. Am Versuchstag 6 wurden die DSS-haltigen Lösungen durch reines Trinkwasser bzw. verdünnte Siliconölemulsion ausgetauscht. Während des gesamten Versuchszeitraums (max. 14 d) standen den Tieren Trinkwasser bzw. verdünnte Siliconölemulsion (DSS-Zusatz zur Trinkflüssigkeit am Tag 1-6) sowie Futter ad libitum zur Verfügung. Die Intaktkontrollgruppe erhielt von Versuchsbeginn an reines Trinkwasser ohne DSS-Zusatz ad libitum. Ein Teil der Tiere bekam ab dem ersten Versuchstag täglich über einen Magenschlauch (Kunststoffschlauch) eine verdünnte Siliconölemulsion bzw. eine 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung (Kontrollgruppe) zur Behandlung der Colitis. Die Lösungen wurden mit Hilfe einer Einwegspritze (Omnifix® F 1 ml; B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen), die mit einer kurzen Kanüle mit aufgesteckten Magenschlauch verbunden war, appliziert. Das offene Ende des Kunststoffschlauchs wurde schräg angeschnitten und vor dem Einführen in die Speiseröhre in eine Glycerol/Wasser-Mischung eingetaucht, um die Gleitfähigkeit des Schlauches zu verbessern und somit die Verletzungsgefahr zu minimieren. Das Gewicht, die Vitalität und der Allgemeinzustand der Tiere wurden täglich registriert.

3.5.2.1 Versuchsgruppen

Die Einteilung der Versuchsgruppen (A-F) ist in Abb. 3-4 dargestellt. Es wurden 3 Versuchsreihen durchgeführt, die im weiteren Verlauf mit 1, 2 bzw. 3 (z.B. A1, A2, A3) bezeichnet werden. Die Emulsionen wurden ab dem ersten Versuchstag (Start der DSS-Gabe) über den Magenschlauch zugeführt, wobei das Applikationsvolumen variierte (0,3 ml oder 0,5 ml), die Siliconölmenge

(0,012 g/Gabe) jedoch konstant blieb. Die untersuchten Emulsionen (Zusammensetzung siehe Tab. 3-12 bzw. für Silfar[®] SE 4 siehe Anhang A2, Tab. A2-1) wurden vor der Gabe mit Wasser verdünnt. Den Tieren der Gruppe B1 stand die Emulsion (3,5 % Siliconöl M500) mit dem Trinkwasser (enthielt am Versuchstag 1-6 auch DSS) ad libitum zur Verfügung.

3.5.3 TNBS-induzierte Colitis

Den Mäusen, die in den Versuch aufgenommen wurden, wurde 24 Stunden vor Colitis-Induktion das Futter entzogen, um die Menge an Kot im Kolon während der TNBS-Gabe zu minimieren. Trinkwasser stand den Tieren weiterhin ad libitum zur Verfügung.

Die TNBS-Stammlösung (5 % (m/V) in Wasser) wurde 1:1 mit 96%igem Ethanol verdünnt. Mit Hilfe einer Kunststoffkanüle (Vasocan[®] Braunüle[®] 20G, B. Braun Melsungen AG, D-Melsungen), die 3 cm proximal in den Anus eingeführt wurde, wurden 100 µl des TNBS/Ethanol-Gemisches (2,5 mg TNBS/Tier) appliziert. Um ein sofortiges Ausfließen der Lösung aus dem Darm zu verhindern, wurden die Mäuse nach der Applikation 30 s in einer Kopfüber-Position gehalten. Die Tiere der Gruppe VII erhielten 48%igen Ethanol. Die Kunststoffkanüle wurde vor dem Einführen in den Anus in eine Glycerol/Wasser-Mischung getaucht, um die Verletzungsgefahr des Darms zu verringern. Nach der TNBS-Gabe wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt. Zur Therapie der induzierten Colitis wurde ausgewählten Gruppen sofort verschiedene, stark verdünnte Emulsionen zum Trinkwasser zugesetzt. Die verdünnten Siliconölemulsionen bzw. reines Trinkwasser sowie Futter standen den Tieren über den gesamten Versuchszeitraum (max. 6 d) ad libitum zur Verfügung. Die Bestimmung des Gewichtes sowie die Beurteilung der Vitalität und des Allgemeinzustands der Tiere erfolgten täglich.

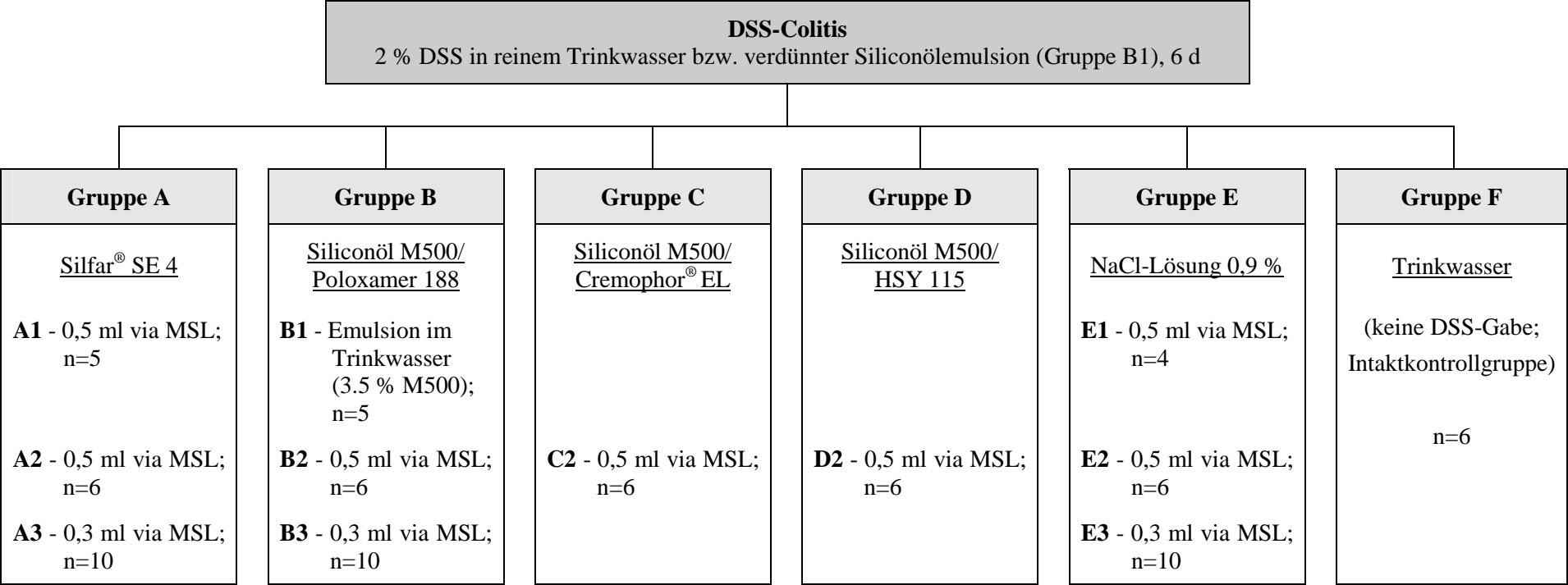
3.5.3.1 Versuchsgruppen

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Die Einteilung der Mäuse erfolgte in 10 Gruppen (siehe Abb. 3-5). Die Beobachtungen der Gruppen I-VII wurden in 3 Teilversuchen erhalten und zusammengefasst. Die untersuchten Emulsionen wurden dem Trinkwasser beigemischt und standen den Tieren sofort nach der TNBS-Applikation bis zum Versuchsende ad libitum zur Verfügung. Die Zusammensetzung der Emulsionen vor der Verdünnung mit Trinkwasser ist in Tab. 3-12 dargestellt.

3.5.4 Versuchsende und Sektion

Am Ende der Versuche wurden die Tiere mit Ether getötet. Bei der anschließenden Sektion der Mäuse erfolgte die Entnahme des Dickdarms und der Milz. Es wurde die Länge des Dickdarms sowie das Gewicht der Milz bestimmt. Der Dickdarm ausgewählter Mäuse wurde außerdem longitudinal geöffnet, gereinigt und anschließend in einer Ethanol/Wasser-Mischung für die elektronenmikroskopische Untersuchung konserviert.

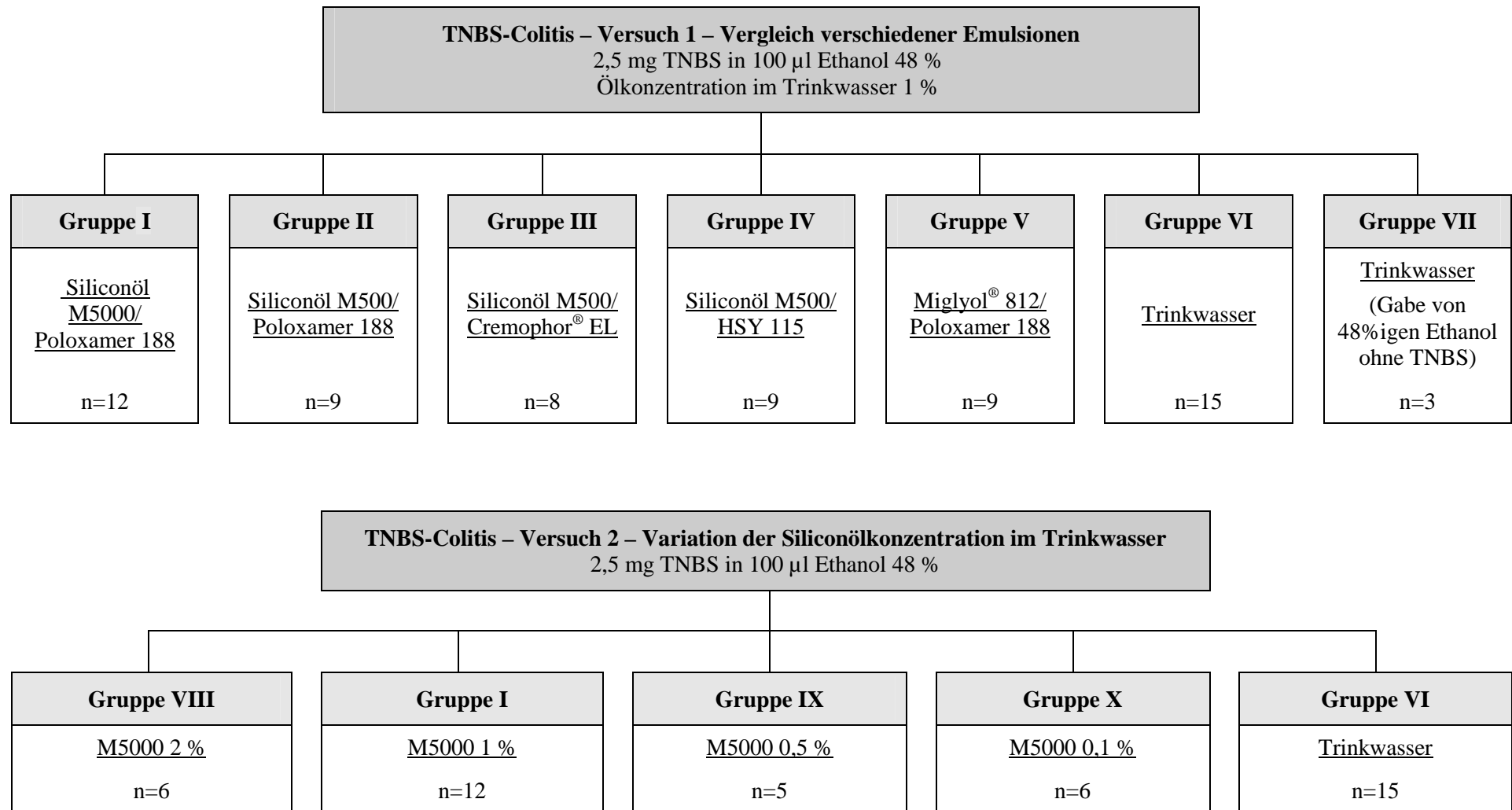
Abb. 3-4: Einteilung der Versuchsgruppen der DSS-induzierten Colitis in C57BL/6-Mäusen (n=Anzahl der Tiere); Durchführung von 3 Versuchsreihen (z.B. A1, A2, A3); Versuchsdauer max. 14 Tage; Therapie der Tiere begann am ersten Versuchstag (parallel zur DSS-Gabe) und wurde über den gesamten Versuchszeitraum fortgesetzt; tägliche Applikation der Emulsionen bzw. NaCl-Lösung erfolgte via Magenschlauch (Abk.: MSL; konstante Siliconölmenge 0,012 g/Gabe) bzw. Zusatz der Emulsion zum Trinkwasser



Tab. 3-12: Zusammensetzung der im Tierexperiment untersuchten Emulsionen (*Emulsion mit HSY 115 wurde nur mit 10 % Siliconöl M500 formuliert)

Substanz	Konzentration (m/m)
Emulgator (Poloxamer 188, Cremophor® EL , HSY 115*)	2 %
Ölkomponente (Siliconöl M500 bzw. M5000, Miglyol® 812)	35 %
2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4	ad 100 %

Abb. 3-5: Einteilung der Versuchsgruppen der TNBS-induzierten Colitis in C57BL/6-Mäusen (n=Anzahl der Tiere); Versuchsdauer max. 6 Tage; Therapie der Tiere begann sofort nach TNBS-Applikation und wurde über den gesamten Versuchszeitraum fortgesetzt; *oben:* Versuch 1 (Gruppen I-VII) - Vergleich verschiedener Emulsionen (Ölkonzentration im Trinkwasser 1 %); *unten:* Versuch 2 (Gruppen I, VI, VIII-X) - Variation der Siliconölkonzentration im Trinkwasser (Angabe der M5000-Konzentration im Trinkwasser; Poloxamer 188-stabilisierte Siliconölemulsion)



4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Herstellung und Charakterisierung der Emulsionen

Um eine gute Compliance bei der angestrebten oralen Therapie der CED mit Siliconölen zu gewährleisten, wurden diese als O/W-Emulsionen formuliert. Das Ziel war dabei, Emulsionen herzustellen, die eine gute Autoklavier- und Lagerstabilität aufweisen. Da Emulsionen mit kleinen Teilchen und engen Größenverteilungen meist eine gute Stabilität besitzen, wurde im Folgenden versucht, durch die Variation verschiedener Parameter stabile Emulsionen mit kleinen Partikeln zu formulieren.

Die Herstellung der Emulsionen erfolgte dabei in Anlehnung an das Patent DE 103 26 188 A1 (238). Die dort von Sachse et al. beschriebenen Siliconölemulsionen wurden mit einem Ölanteil von 20 %, 35 % oder 40 % und 1 %, 2 % oder 3 % Emulgator (z.B. Tween® 80, Poloxamer 188, Lipoid E80) in der wässrigen Phase bei Raumtemperatur formuliert. Die wässrige Phase und die Ölphase wurden dabei zunächst mittels Ultra-Turrax T8 (Stufe 4-5) 5 Minuten voremulgiert und anschließend mittels Hochdruckhomogenisation (APV-1000 Gaulin-Ringspalthomogenisator) bei einem Arbeitsdruck von 700 bar in 6 Zyklen (selten in 10 Zyklen) weiter dispergiert.

Die Charakterisierung der hergestellten Emulsionen erfolgte hinsichtlich ihrer Partikelgröße und ihrer Stabilität. Im Folgenden wird zunächst der Einfluss der Prozessparameter diskutiert.

4.1.1 Einfluss der Prozessparameter

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Zyklenzahl sowie des Homogenisationsdruckes auf die Qualität der Emulsion geprüft. Zu diesem Zwecke wurden zwei unterschiedlich viskose Siliconöle (M100 und M500) in einer Konzentration von 35 % eingesetzt, die mit 2 % Tween® 80 in der wässrigen Phase (Wasser ad 100 %) stabilisiert wurden. Jede Emulsion wurde zunächst mittels Ultra-Turrax voremulgiert (s. Kapitel 3.2.1) und anschließend unter Variation der Bedingungen homogenisiert (n=1). Als Maß für die Qualität der Emulsionen erfolgte die Bestimmung der Partikelgrößen mittels Laserdiffraktometrie.

Da Siliconöle eine sehr geringe Temperatur-Viskositäts-Abhängigkeit aufweisen (45), wurde die Temperatur bei der Homogenisation nicht variiert und die Herstellung bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.1.1.1 *Homogenisationsdruck*

Zunächst erfolgte die Beurteilung des Einflusses des Homogenisationsdruckes auf die Partikelgröße (Median) der Emulsionen. Der Herstellungsdruck wurde dazu in einem Bereich von 300-1400 bar variiert. Die Anzahl der Homogenisationszyklen betrug immer 10.

Die Emulsionen mit den beiden unterschiedlich viskosen Siliconölen M100 und M500 zeigten teilweise ein ähnliches Verhalten. Bei den M100-Siliconölemulsionen war zunächst eine geringe Abnahme der Partikelgröße mit zunehmendem Homogenisationsdruck zu beobachten (Abb. 4-1, *links*). Die geringste Partikelgröße der M100-Emulsion wurde bei einem Druck von 500 bar ($D50_{(500\text{bar})}=0,52\text{ }\mu\text{m}$) erzielt. Eine weitere Zunahme des Homogenisationsdruckes führte zunächst zu einem geringen Anstieg der Partikelgröße (500-1000 bar), der durch eine weitere Erhöhung des Druckes (1000-1400 bar; $D50_{(1400\text{bar})}=0,72\text{ }\mu\text{m}$) dann deutlich zunahm.

Auch bei den M500-Siliconölemulsionen war zu Beginn eine Abnahme der Partikelgröße mit steigendem Homogenisationsdruck zu beobachten. Hier wurde jedoch erst bei einem Betriebsdruck von 1000 bar eine minimale Teilchengröße ($D50_{(1000\text{bar})}=1,22\text{ }\mu\text{m}$) erzielt (Abb. 4-1, *links*). Die M500-Siliconölemulsionen wiesen im Vergleich zu den M100-Siliconölemulsionen prinzipiell größere Partikel auf (bei gleichen Herstellungsbedingungen). Aufgrund der höheren Viskosität des M500 Siliconöls im Vergleich zum Siliconöl M100 verschlechterte sich das Dispergierergebnis, da der Tropfenaufbruch mit steigender Viskosität der dispersen Phase erschwert wird (siehe auch Kapitel 4.1.2.1) (239). Eine weitere Erhöhung des Drucks ($> 1000\text{ bar}$) führte auch bei der M500-Emulsion zu einer Zunahme der Partikelgröße infolge einer Deemulgierung der Emulsion („Overprocessing“) ($D50_{(1400\text{bar})}=1,41\text{ }\mu\text{m}$) (240,241).

Die beobachtete Deemulgierung ist durch den erhöhten Energieeintrag bei der Herstellung bedingt, der zur Ausbildung einer sehr großen Grenzfläche führt. Wird diese neu gebildete Grenzfläche nicht schnell genug mit Emulgatormolekülen belegt, kann eine Koaleszenz der bereits aufgebrochenen Tropfen und somit eine Zunahme der Partikelgröße der Emulsion (Deemulgierung) auftreten (26,242). Die Stabilisierung der neu entstandenen Emulsionstropfen wird limitiert durch die Desaggregationsgeschwindigkeit der Tensidmizellen in der wässrigen Phase sowie durch die Diffusions- und Adsorptionsgeschwindigkeit der Emulgatormoleküle zur bzw. an der Grenzfläche (26,242). Ein zu hoher

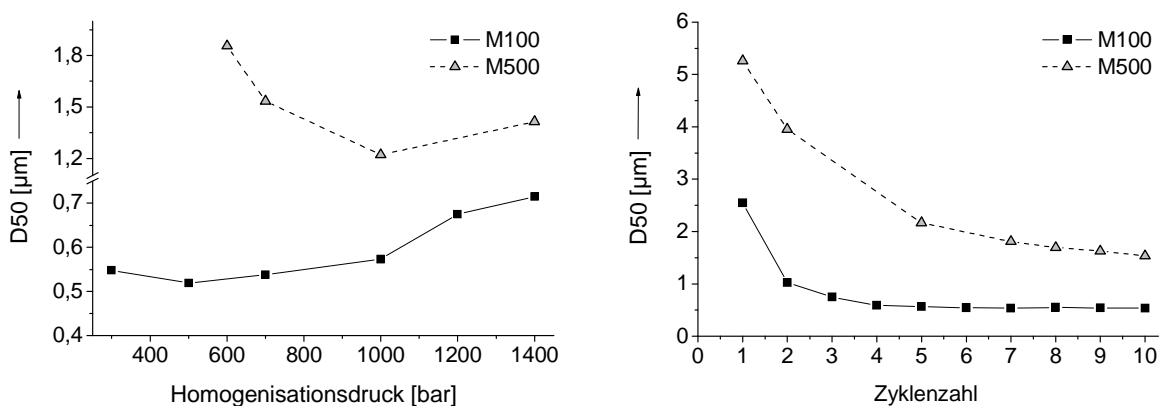


Abb. 4-1: Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der Prozessparameter (LD-PIDS Messungen); Vergleich der M100- und M500-Siliconölemulsion ($n=1$); *links*: Abhängigkeit des Medians der Teilchengrößenverteilung vom Homogenisationsdruck; *rechts*: Abhängigkeit des Medians der Teilchengrößenverteilung von der Zyklenzahl

Homogenisationsdruck führt also aufgrund der beobachteten Deemulgierung nicht zur Abnahme der Partikelgröße, sondern zu einer Verschlechterung des Emulgiererergebnisses.

Auch von Sachse et al. wurde eine mit 2 % Tween[®] 80 stabilisierte Siliconölemulsion in 10 Zyklen mit einem Homogenisationsdruck von 700 bar hergestellt, jedoch mit dem viskoserem Siliconöl M1000 (Anteil 35 %). Trotz der höheren Viskosität der Ölphase wurden deutlich kleinere Teilchengrößen der Emulsion mittels PCS bestimmt (z -Average=206,5 nm) (238). Eine mögliche Ursache dafür könnte der Einsatz unterschiedlichen Homogenisator-Typen sein, die aber beide nach dem Kolben-Spalt-Prinzip arbeiten.

4.1.1.2 Zyklenzahl

Zur Untersuchung des Einflusses der Zyklenzahl wurden die herzustellenden Emulsionen in 10 Einzelschritten bei 700 bar homogenisiert. Die Wahl des Druckes erfolgte unter Berücksichtigung der oben vorgestellten Ergebnisse (Kapitel 4.1.1.1). Da bei den M100-Emulsionen bereits ab einem Druck von > 500 bar eine Zunahme, bei den M500-Emulsionen jedoch erst bei 1000 bar eine minimale Teilchengröße erzielt werden konnte (siehe Abb. 4-1, *links*), wurde ein Homogenisationsdruck von 700 bar gewählt. Nach den einzelnen Zyklen wurde je eine Probe von ca. 0,5 ml entnommen und mittels Laserdiffraktometrie charakterisiert.

Bei der Herstellung der M100-Siliconölemulsion nahm die Partikelgröße bereits nach dem 2. Homogenisationszyklus stark ab (Abb. 4-1, *rechts*). Mit zunehmender Zyklenzahl kam es nur noch zu einer geringen Abnahme der Teilchengröße, die nach dem 6. Zyklus (Z_6 : $D_{50}=0,546 \mu\text{m}$ vs. Z_{10} : $D_{50}=0,538 \mu\text{m}$) keine signifikante Reduktion mehr zeigte. Dagegen war bei der höher viskosen M500-Siliconölemulsion bis zum 10. Homogenisationszyklus eine Abnahme des Medians der Teilchengrößenverteilung zu beobachten. Die Reduktion der Partikelgröße wurde jedoch nach dem 5. Zyklus deutlich geringer.

Abschließend kann man feststellen, dass bei beiden untersuchten Emulsionen mit zunehmender Zyklenzahl eine Reduktion der Teilchengröße zu beobachten ist, die jedoch mit steigender Anzahl der Homogenisationszyklen geringer wird. Auch hier ist wie bei den Untersuchungen zum Homogenisationsdruck ein deutlicher Einfluss der Viskosität der inneren Phase auf die Partikelgröße der Emulsionen zu erkennen. Die Siliconölemulsion mit dem viskoserem Siliconöl M500, weist wieder größere Partikel auf als die M100-Siliconölemulsion, obwohl beide mit gleichem Druck und gleicher Zyklenzahl hergestellt wurden.

4.1.1.3 Wahl der Standardprozessparameter

Die Untersuchungen zeigen, dass sowohl der Homogenisationsdruck wie auch die Zyklenzahl einen deutlichen Einfluss auf die Partikelgröße der Siliconölemulsionen haben. Die Standardhomogenisationsbedingungen wurden unter Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse zum Einfluss der Prozesspa-

parameter gewählt. Alle Emulsionen in den folgenden Abschnitten wurden, falls nicht anders erwähnt, bei einem Homogenisationsdruck von 700 bar und in 10 Zyklen bei Raumtemperatur hergestellt.

4.1.2 Einfluss weiterer Parameter auf die Partikelgröße der Siliconölemulsionen

Die Partikelgröße von Emulsionen ist nicht nur von der Leistungsfähigkeit der Homogenisation, die durch die verschiedenen Prozessparameter beeinflusst wird, abhängig (239,243-245). Auch die Zusammensetzung der Emulsion, die Viskosität der inneren und äußeren Phase sowie das Autoklavieren der Produkte können die Teilchengrößenverteilungen der Zubereitungen deutlich beeinflussen (239,245-247). Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss dieser verschiedenen Parameter (Ausnahme: Einfluss der Viskosität der äußeren Phase; siehe Kapitel 4.2) auf die Partikelgröße der Siliconölemulsionen vorgestellt und diskutiert.

4.1.2.1 Viskosität der Siliconöle

Da in den Untersuchungen zur Variation der Prozessparameter (Kapitel 4.1.1) bereits ein Einfluss der Siliconölviskosität auf die Partikelgröße der Emulsionen festgestellt werden konnte, wurden weitere Versuche zur Abhängigkeit der Teilchengröße der Emulsionen von der Viskosität der dispersen Phase durchgeführt. Dazu wurden 6 verschieden viskose Siliconöle in einem Viskositätsbereich von 10-1000 mm²·s⁻¹ ausgewählt (siehe auch Tab. 3-1). Die Emulsionen wurden mittels Hochdruckhomogenisation unter Standardbedingungen hergestellt und mit 2 % Cremophor® EL bzw. mit 2 % einer Mischung von Span® 80 und Tween® 80 (HLB 8,5; siehe Kapitel 3.1.2) stabilisiert. Mit dem Emulgator bzw. dem Emulgatorgemisch wurden die sechs unterschiedlich viskosen Siliconöle (35 %) als O/W-Emulsionen formuliert und anschließend der Einfluss der Viskosität des eingesetzten Siliconöls auf die Partikelgröße beurteilt.

Wie in Abb. 4-2 (*links*) dargestellt, nahm der Median der Teilchengrößenverteilungen mit steigender Viskosität des verarbeiteten Siliconöls im untersuchten Viskositätsbereich bei beiden Reihen (Cremophor® EL und HLB 8,5) linear zu. Die Zerkleinerung der Tropfen bei der Homogenisation wird mit steigender Viskosität der inneren Phase (des Siliconöls) erschwert. Dieser Effekt wurde auch bereits von Kawaguchi und Kubota beobachtet, die unterschiedlich viskose Siliconöle mit Hydroxypropylmethylcellulose als O/W-Emulsionen formulierten (248). Die viskosereren Siliconöltropfen werden in Folge ihrer höheren Zähigkeit trotz gleicher Homogenisationsbedingungen nicht so stark zerkleinert wie niedriger viskose Öltröpfchen (239,246,247).

Außerdem konnte beobachtet werden, dass die mit dem Emulgatorgemisch von Span® 80 und Tween® 80 (HLB 8,5) stabilisierten Zubereitungen einen größeren Anstieg der Partikelgröße aufwiesen als die Emulsionen, die mit Cremophor® EL formuliert wurden (Abb. 4-2, *links*). Dies könnte ein möglicher Hinweis auf eine schlechtere Stabilisierung der neu entstandenen Partikel durch das Emulgatorgemisch HLB 8,5 sein.

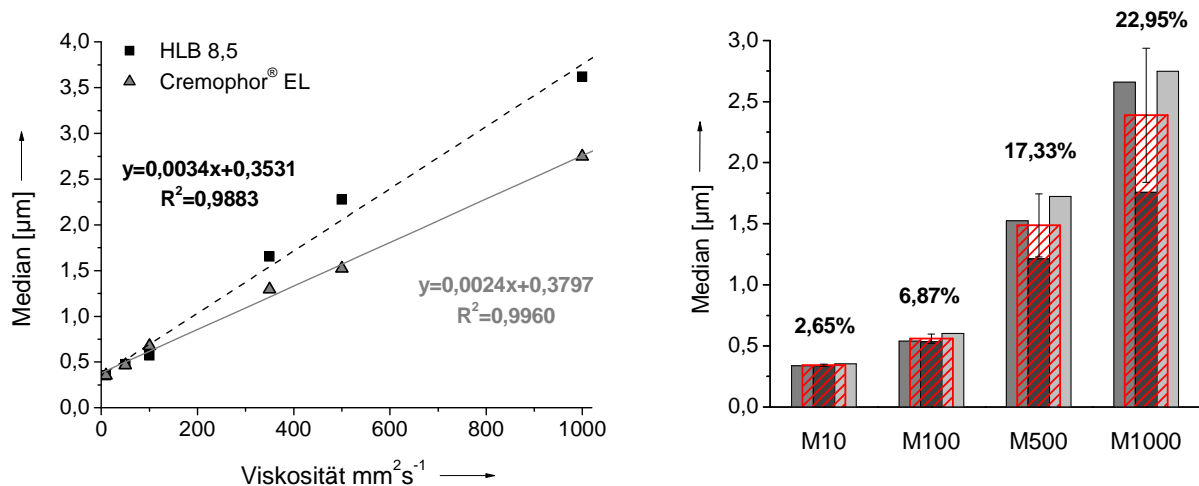


Abb. 4-2: links: Einfluss der Viskosität des eingesetzten Siliconöls auf den Median der Teilchengrößenverteilung der formulierten O/W-Emulsionen ($n=1$) unter Verwendung von zwei verschiedenen Emulgatoren (Emulgatormischung HLB 8,5 und Emulgator Cremophor[®] EL); rechts: Vergleich der Reproduzierbarkeit der Mediane unterschiedlich viskoser Siliconölemulsionen ($n=3$); graue Balken → Mediane der wiederholten Emulsionsherstellung, schraffiert → Mittelwert der Mediane mit Angabe der relativen Standardabweichung in [%]; Bestimmung der Teilchengrößenverteilungen mittels Laserdiffraktometrie

Auffallend war ebenfalls, dass mit zunehmender Siliconölviskosität die Reproduzierbarkeit der Teilchengrößenverteilungen der Emulsionen gleicher Zusammensetzung erschwert wurde. Jede Emulsion wurde dreimal unter Standardbedingungen hergestellt. Mit zunehmender Viskosität des verwendeten Siliconöls schwankte der Median der Teilchengrößenverteilungen stärker, was auch an der deutlichen Zunahme der relativen Standardabweichung zu erkennen ist (Abb. 4-2, rechts). Bei den Emulsionen mit dem niedrig viskosen Siliconöl M10 konnte im Gegensatz zu den hochviskosen M1000-Siliconölemulsionen eine gute Reproduzierbarkeit der Messparameter (Mean, D50, D99) beobachtet werden.

4.1.2.2 Emulgatoreinfluss auf die Partikelgröße von M10- und M500-Siliconölemulsionen

Für die Herstellung der Siliconölemulsionen wurden nicht nur verschieden viskose Siliconöle, sondern auch diverse Emulgatoren zur Stabilisierung der entstandenen Siliconöltröpfchen eingesetzt. Die Auswahl der verwendeten oberflächenaktiven Substanzen erfolgte unter anderem auch im Hinblick auf ihre Toxizität, da im weiteren Verlauf der Arbeit in-vitro- und in-vivo-Experimente zur Untersuchung der Wirksamkeit der Siliconölemulsionen geplant waren und somit eine toxische Wirkung des Emulgators ausgeschlossen werden sollte. Jelinek und Klöcking (249) beurteilten die Cytotoxizität verschiedener nichtionischer und ionischer Emulgatoren an U937-Zellen. Sie stellten bei Poloxamer 188, Cremophor[®] EL, Sojalecithin und Tween[®] 80 nur eine äußerst geringe Toxizität fest und stuften diese untersuchten Substanzen als nicht reizend ein (250). Auch für die verwendeten Saccharoseester und Hydroxypropylmethylcellulosen ist eine gute Verträglichkeit beschrieben (197). Außerdem wurde

zur Stabilisierung der Emulsionen ein Silicontensid (Wacker Belsil® DMC 6031) eingesetzt. Da sowohl der lipophile Anteil des Silicontensids wie auch Siliconöle aus linearen Siloxanketten aufgebaut sind, könnte man eine gute Wechselwirkungen zwischen Siliconöl und Silicontensid vermuten und folglich eine stabile Emulsion erwarten.

Die Emulsionen wurden unter Standardbedingungen unter Verwendung des niedrig viskosen Siliconöls M10 und des höher viskosen M500 hergestellt (Rezeptur siehe Tab. 4-1). Es wurden zwei verschieden viskose Siliconöle ausgewählt, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Viskosität der inneren Phase die Partikelgröße der Emulsion deutlich beeinflusst (Kapitel 4.1.2.1).

Tab. 4-1: Zusammensetzung der Emulsionen

Substanz	Konzentration (m/m)
Emulgator (Ausnahmen: HPMC 0,5 % Phospholipid S100 4,2 %)	2 %
Siliconöl	35 %
Wasser	ad 100 %

Im Folgenden wird die Bedeutung des Emulgators für die Partikelgröße, die nach der Herstellung (vA)^b bestimmt wurde, diskutiert. Zur Herstellung der Siliconölemulsionen wurden u.a. verschiedene Hydroxypropylmethylcellulosen bzw. Saccharoseester eingesetzt (siehe auch Kapitel 3.1.2). Um jedoch den Vergleich mit weiteren untersuchten Emulgatoren übersichtlich zu gestalten, fand zunächst nur jeweils ein Vertreter aus der Gruppe der Hydroxypropylmethylcellulosen bzw. der Saccharoseester Berücksichtigung. Die Abhängigkeit des Medians der Teilchengrößenverteilungen der M10- und M500-Siliconölemulsionen vom eingesetzten Stabilisator ist in Abb. 4-3 dargestellt.

Die Siliconölemulsionen, die mit den hydrophilen, nichtionischen Emulgatoren Tween® 80 und Cremophor® EL hergestellt wurden, wiesen sowohl für die M10- wie auch für die M500-Emulsionen einen ähnlichen Partikelgrößenbereich auf. Deutlich größere Partikel waren dagegen bei den mit Span® 80 stabilisierten Emulsionen, insbesondere bei der M500-Siliconölemulsion, zu beobachten. Span® 80 ist aufgrund seiner Hydrophobizität (HLB 4,3) (207) in Wasser nicht löslich und wurde aus diesem Grund in der Ölphase dispergiert. Span® 80 ist besser für die Herstellung von W/O-Emulsionen geeignet (197).

Mischt man jedoch Span® 80 und Tween® 80 in einem Verhältnis, so dass ein HLB-Wert von 8,5 eingestellt wird (siehe Kapitel 3.1.2), zeigte die M10-Emulsion ein ähnliches Verhalten wie die Tween® 80-stabilisierte Emulsion. Die entsprechende M500-Emulsion wies dagegen größere Partikel auf, die aber dennoch deutlich kleiner sind als die der reinen Span® 80-M500-Emulsion.

^b Ein Teil jeder Emulsion wurde nach der Herstellung autoklaviert (siehe Kapitel 4.1.2.3). Die hier gezeigten Partikelgrößen wurden vor dem Autoklavieren (vA) der Proben bestimmt.

Unter Einsatz des Phospholipids S100, des Blockcopolymers Poloxamer 188 und des Zuckeresters S570 wurden M10-Emulsionen mit sehr kleinen Partikeln erzielt. Aufgrund der vergleichsweise hohen kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von Poloxamer 188 (251) liegen die Poloxamer 188-Moleküle vermutlich in der eingesetzten Konzentration frei und nicht in Form von Mizellen vor. Sie sind somit gut verfügbar für die Stabilisierung der neu gebildeten Grenzfläche.

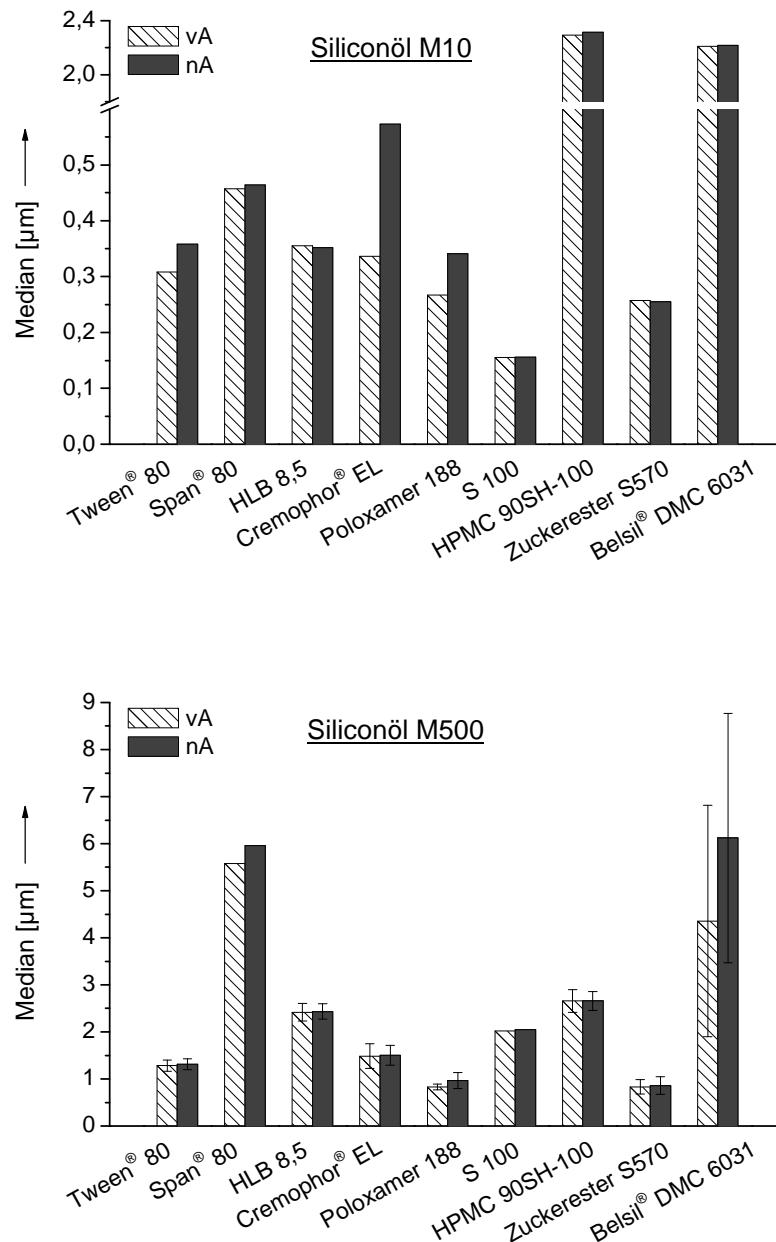
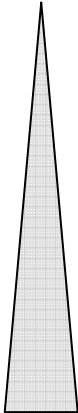


Abb. 4-3: Vergleich der Median-Werte der Teilchengrößenverteilungen (LD-PIDS-Messungen) der mit verschiedenen Emulgatoren stabilisierten Siliconölemulsionen vor (vA) und nach dem Autoklavieren (nA); *oben:* Emulsionen mit Siliconöl M10 (n=1); *unten:* Emulsionen mit Siliconöl M500 (n=3; Ausnahme: Span® 80- und S100-stabilisierte Emulsionen (n=1)); die Abbildungen unterscheiden sich hinsichtlich der Skalierung ihrer y-Achse

Bei der Herstellung der Emulsion mit dem Phospholipid S100 ist es möglich, dass neben der Emulgierung der Siliconöltröpfchen auch S100-Liposomen gebildet werden, die für den geringen Median der M10-Emulsion verantwortlich sein könnten (252,253). Die entsprechende M500-Emulsion wies allerdings im Vergleich zu den Poloxamer 188- bzw. Zuckerester S570-stabilisierten Zubereitungen (Median < 1 µm) deutlich größere Partikel (Median > 2 µm) auf.

Die größten Median-Werte wurden bei den M10-Siliconölemulsionen unter Verwendung der Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC 90SH-100) und des Silicontensids Wacker Belsil® DMC 6031 erzielt. Bei den M500-Emulsionen war ein ähnliches Verhalten feststellbar, wobei hier jedoch die Hydroxypropylmethylcellulose aufgrund einer geringeren Partikelgröße der Zubereitung geeigneter zur Stabilisierung scheint. Die zur Formulierung der Emulsionen verwendeten Hydroxypropylmethylcellulosen wurden nur in einer Konzentration von 0,5 % zur Herstellung der Emulsionen eingesetzt (sonst 2 % Emulgator). Bei höheren HPMC-Konzentrationen waren die äußeren Phasen zu viskos für eine erfolgreiche Hochdruckhomogenisation. Hydroxypropylmethylcellulosen weisen außerdem ein sehr hohes Molekulargewicht auf. Daher stehen im Vergleich zu niedermolekularen Emulgatoren (z.B. Tween® 80) beim Einsatz gleicher Mengen weniger Moleküle zur Stabilisierung der Emulsionstropfen zur Verfügung. Dies und die niedrigere Konzentration im Vergleich zu den anderen Emulgatoren, könnten eine Ursache für die vergleichsweise großen Partikel der Formulierungen mit HPMC, insbesondere der M10-Emulsion, sein.

Es konnte also ein deutlicher Einfluss des Emulgators auf die Teilchengrößenverteilungen der Emulsionen, im Speziellen auf den Median-Wert, beobachtet werden. In der Literatur ist für die Emulgierung von Siliconölen ein erforderlicher HLB-Wert von 11 angegeben (27,254). Um Siliconöle zu emulgieren, sollte also ein Emulgator bzw. ein Emulgatorgemisch mit ähnlichem HLB-Wert verwendet werden. Ein Zusammenhang zwischen dem HLB-Wert der eingesetzten nichtionischen Stabilisatoren (ohne Berücksichtigung von Phospholipid S100 und HPMC 90SH-100) und der Partikelgröße der M10-Emulsionen ist jedoch nicht zu erkennen (Tab. 4-2).

Emulgator	Median (vA) M10-Emulsionen	HLB-Wert (200,205,207,208)
Zuckerester S570		5
Poloxamer 188		29
Tween® 80		15
Cremophor® EL		12-14
HLB 8,5		8,5
Span® 80		4,3
Belsil® DMC 6031		11-12

Tab. 4-2: Zunahme des Medians (vA) der Teilchengrößenverteilung der M10-Siliconölemulsionen in Abhängigkeit vom eingesetzten nichtionischen Emulgator sowie Darstellung der entsprechenden HLB-Werte

Die geringsten Teilchengrößen wurden bei den Zuckerester S570- und den Poloxamer 188-stabilisierten M10- und M500-Siliconölemulsionen gemessen. Die HLB-Werte beider Emulgatoren sind jedoch deutlich kleiner bzw. größer als der laut Literatur erforderliche HLB-Wert für die Emulgierung von Siliconölen. Sowohl für die M10- wie auch für die M500-Emulsionen (nicht dargestellt) konnte keine Korrelation zwischen der Partikelgröße der Formulierungen und den HLB-Werten der eingesetzten Emulgatoren festgestellt werden.

Interessant ist, dass mit dem hydrophoben Zuckerester S570 (HLB 5) die Herstellung von fein dispersen Siliconölemulsionen möglich war. Die Span[®] 80-stabilisierten Emulsionen dagegen zeigten trotz eines ähnlichen HLB-Wertes im Vergleich zum Zuckerester S570 deutlich größere Partikel. Die Stabilisierung der Emulsionen wird folglich nicht nur durch die Hydrophilic-Lipophilic-Balance (bei nichtionischen Emulgatoren) beeinflusst.

Die Wirkung eines Emulgators ist außerdem stark von seiner Diffusionsgeschwindigkeit und der anschließenden Adsorption an der neu gebildeten Grenzfläche abhängig. Erfolgt nur eine langsame Anlagerung und Spreitung der Emulgatormoleküle an der Grenzfläche der Tröpfchen, führt dies zur Koaleszenz der neu gebildeten Tröpfchen (26). Somit ist auch der deutliche Einfluss der Emulgatorauswahl auf die Teilchengrößenverteilung der Emulsionen zu erklären. Prinzipiell wäre es möglich, mit jedem der eingesetzten Emulgatoren eine zunächst stabile Zubereitung zu formulieren. Besonders geeignet zur Stabilisierung der Siliconölemulsionen waren die Emulgatoren Poloxamer 188, S570, Tween[®] 80, Cremophor[®] EL sowie das Phospholipid S100.

Auch der Einfluss der Viskosität des verwendeten Siliconöls auf die Partikelgröße der Emulsionen konnte in diesen Untersuchungen wieder beobachtet werden, da die M500-Emulsionen deutlich größere Partikel als die M10-Emulsionen aufwiesen (siehe auch Kapitel 4.1.2.1).

4.1.2.3 Einfluss des Autoklavierprozesses auf die Partikelgröße der M10- und M500-Siliconölemulsionen

Jeweils eine Fraktion der M10- und M500-Siliconölemulsionen, die in Abschnitt 4.1.2.2 in Bezug auf ihre Partikelgröße ausführlich beschrieben sind, wurde nach der Herstellung autoklaviert. Für die geplanten mikrobiologischen Versuche ist die Sterilität der Emulsionen von großer Bedeutung und auch für die tierexperimentellen Untersuchungen ist eine geringe Keimbelastung der Proben anzustreben. Außerdem beobachteten Sachse et al. (238) eine Reduktion der mittleren Teilchengröße infolge einer Hitzesterilisation bei Siliconölemulsionen, die mit Tween[®] 80 stabilisiert wurden. Die Charakterisierung der Proben erfolgte vor und nach dem Autoklavieren mittels Laserdiffraktometrie bzw. von ausgewählten Proben zusätzlich mittels eines optischen Einzelpartikelanalysegerätes (SPOS).

Drei der untersuchten M10-Siliconölemulsionen wiesen nach dem Autoklavieren eine deutliche Zunahme der Partikelgröße auf (Abb. 4-3, oben). Die Autoklavierinstabilität der Poloxamer 188-, Tween[®] 80- und Cremophor[®] EL-stabilisierten Zubereitungen konnte auch in weiteren Versuchen gezeigt werden. Auch in der Literatur ist für O/W-Emulsionen mit anderen Ölkomponten (z.B.

mittelkettige Triglyceride, Sojaöl), die mit diesen Emulgatoren hergestellt wurden, ein Partikelgrößenwachstum infolge einer Hitzesterilisation beschrieben (227,255).

Während der Dampfsterilisation der Emulsionen kommt es aufgrund der hohen Temperatur (121°C) zur Überschreitung des Cloud Points von Tween® 80 und Cremophor® EL (256). Dies bedingt eine Dehydratation der Polyoxyethylengruppen der beiden Stabilisatoren und eine Zunahme der hydrophoben Eigenschaften der Emulgatormoleküle (23,257,258). Beim Autoklavieren der M10-Emulsionen mit Tween® 80 und Cremophor® EL ist es möglich, dass die beiden Emulgatoren aufgrund ihres verstärkten hydrophoben Charakters sich in der Ölphase lösen oder inverse Mizellen bilden. Folglich wird der Grenzflächenfilm um das Siliconöltröpfchen zerstört. Dieser Effekt kann schließlich zur Koaleszenz und zum Größenwachstum der Partikel führen.

Die Kombination von Tween® 80 mit dem hydrophoben Span® 80 (HLB 8,5) führt zur Ausbildung eines mechanisch stabilen Grenzflächenfilmes (27,259). Durch das unterschiedliche Verhältnis von hydrophilem und lipophilem Anteil beider Emulgatoren nähern sich diese im Grenzflächenfilm stärker an und treten miteinander in Wechselwirkung. Auch die in der Literatur diskutierte spezifische Ionenadsorption von Hydroxid-Ionen an den Etherbrücken der PEG-Einheiten von nichtionischen Emulgatoren könnte eine Rolle spielen (31,32). Folglich würde die elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Kopfgruppen des Tween® 80 durch die Span® 80-Moleküle verringert werden und die Stabilität des Grenzflächenfilms würde zunehmen (23). Diese Effekte könnten dazu beitragen, dass die Koaleszenzwahrscheinlichkeit der mit Tween® 80 und Span® 80 stabilisierten Siliconöltröpfchen während des Autoklavierens reduziert wird. Die M10-Siliconölemulsion, die mit dem Emulgatormisch (HLB 8,5) stabilisiert wurde, zeigte daher keine Zunahme der Partikelgröße nach dem Autoklavierprozess.

Auch bei der Poloxamer 188-stabilisierten M10-Emulsion konnte ein Partikelgrößenwachstum infolge der Hitzesterilisation beobachtet werden. Das Blockcopolymer Poloxamer 188 besitzt einen vergleichsweise hohen Cloud-Point (ca. 105°C (260,261)), der jedoch beim Autoklavieren der Emulsion wie auch bei Tween® 80 und Cremophor® EL überschritten wird. Demzufolge nehmen die hydrophoben Eigenschaften von Poloxamer 188 zu und es erfolgt eine Veränderung des Grenzflächenfilmes, die die Koaleszenz der Partikel bedingt. Jumaa und Müller konnten außerdem für Poloxamer 188-stabilisierte Fettemulsionen zeigen, dass das Partikelgrößenwachstum infolge des Autoklavierprozesses von der verwendeten Ölphase sowie von der Emulgatorkonzentration abhängig ist (227). Mit zunehmender Konzentration an Poloxamer 188 in der äußeren Phase waren die untersuchten Fettemulsionen nach dem Autoklavieren stabil und zeigten keine Zunahme des Median-Wertes. Eine zu geringe Konzentration an Poloxamer 188 bei der Herstellung der Siliconölemulsion könnte demnach auch eine mögliche Ursache für die durch die Dampfsterilisation bedingte Instabilität der Emulsion sein.

Keine Autoklavierinstabilität war dagegen bei der mit Wacker Belsil® DMC 6031 und 35 % Siliconöl M10 formulierten Emulsion (n=1) erkennbar. Die Emulsion wurde ein weiteres Mal mit nur 10 % Siliconöl M10 (aber 2 % Emulgator) hergestellt und hitzesterilisiert. Die 10%ige Siliconölemulsion

zeigte jedoch eine deutliche Zunahme der Partikelgröße nach dem Autoklavieren (D50: vA-0,413 μm vs. nA-2,085 μm ; siehe auch Abschnitt PEG/PPG-Dimeticon, S.66).

Alle anderen Zubereitungen des Siliconöls M10 (Stabilisierung mit Zuckertensid S570, HPMC 90SH-100, Phospholipid S100 bzw. Span[®] 80) wiesen keine Zunahme der Median- bzw. der D99-Werte nach dem Autoklavieren der Emulsionen auf (siehe auch Anhang A1).

Eine Autoklavierinstabilität der Formulierungen, die mit dem höher viskosen Siliconöl M500 hergestellt wurden, war nur bei den Poloxamer 188-, Span[®] 80- und Wacker Belsil[®] DMC 6031-stabilisierten Proben zu beobachten (Abb. 4-3, *unten*). Eine Instabilität der Poloxamer 188-haltigen M500-Emulsionen trat jedoch nur bei einem von drei Herstellungsansätzen auf. Die Teilchengröße der jeweiligen Emulsion hatte dabei keinen Einfluss auf deren Autoklavierstabilität (siehe Tab. 4-3).

Tab. 4-3: Vergleich der D50- und D99-Werte der Teilchengrößenverteilungen von Poloxamer 188-stabilisierten M500-Emulsionen hinsichtlich ihrer Autoklavierstabilität (vA - vor dem Autoklavieren, nA - nach dem Autoklavieren; (+) stabil, (-) instabil)

Ansatz	D50 [μm]		D99 [μm]		Autoklavierstabilität
	vA	nA	vA	nA	
1	0,90	0,89	2,76	2,78	+
2	0,78	1,16	2,76	8,55	-
3	0,70	0,69	2,17	2,15	+

Aufgrund des großen Medians der Span[®] 80-stabilisierten M500-Zubereitung (siehe Abb. 4-3, *unten*) ist zu erkennen, dass der Emulgator nicht optimal für die Herstellung und Stabilisierung dieser Siliconölemulsion geeignet ist. Als Folge der nicht ausreichenden Stabilisierung der Partikel kommt es durch die Energiezufuhr während des Autoklavierprozesses zu einer geringen Zunahme der Teilchengröße. Ein deutlicheres Partikelgrößenwachstum infolge der Sterilisation konnte bei der Belsil[®] DMC 6031 haltigen M500-Emulsion beobachtet werden. Auffällig ist bei diesen Emulsionen (M500/Belsil[®] DMC 6031) die große Schwankung des Medians der Teilchengrößenverteilungen. Die Emulsion wurde 3-mal hergestellt, und auch hier zeigte nur eine der Proben eine Autoklavierinstabilität. Bei der Herstellung dieser Emulsionen konnte bereits beobachtet werden, dass infolge einer zu starken Temperaturerhöhung der Emulsion durch die Hochdruckhomogenisation sich die Phasen der Emulsionen wieder trennten. Kühlt man jedoch die Formulierung zwischen den einzelnen Homogenisationsschritten wieder auf Raumtemperatur ab, erhält man eine homogene Emulsion. Die Autoklavierinstabilität der Belsil[®] DMC 6031-stabilisierten Zubereitungen kann ebenfalls auf die Dehydratation der Polyoxyethylengruppen des Emulgators zurückgeführt werden (siehe oben). Der Cloud-Point einer wässrigen 1%igen Belsil[®] DMC 6031-Lösung wurde experimentell bei $36,6^\circ\text{C} \pm 0,6^\circ\text{C}$ ermittelt. Alle weiteren M500-Emulsionen zeigten keine Veränderung der Teilchengrößenverteilung nach der Sterilisation. Vier ausgewählte, autoklavierstabile Zubereitungen, die mit dem Siliconöl M500 hergestellt wurden, wurden außerdem mittels optischer Einzelpartikelanalyse (SPOS) charakterisiert.

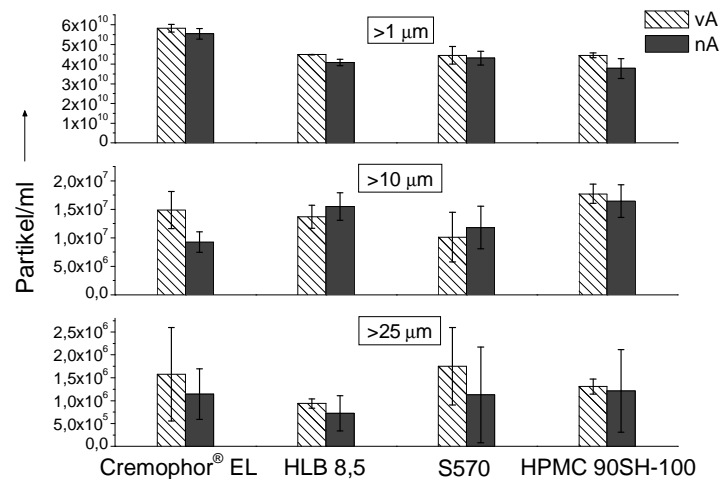


Abb. 4-4: Vergleich der Partikelanzahl/ml für drei verschiedene Partikeldurchmesser (> 1 µm, > 10 µm, > 25 µm) sowie von vier ausgewählten M500-Siliconölemulsionen vor und nach dem Autoklavieren (vA und nA); Bestimmung mittels SPOS (n=3)

In Abb. 4-4 ist zu erkennen, dass auch mittels SPOS keine bedeutende Veränderung im Anteil der großen Partikel der untersuchten Emulsionen nach dem Autoklavieren festzustellen war. Die Ergebnisse der Laserdiffraktometrie, die auf eine Autoklavierstabilität der entsprechenden Emulsionen hinweisen, konnten somit bestätigt werden (Abb. 4-3, unten). Bei der Anzahl der Partikel mit einem Durchmesser > 25 µm (SPOS-Messung) wurden jedoch auffällig große Standardabweichungen beobachtet. Diese sind durch große Schwankungen zwischen den Einzelmessungen bedingt, da aufgrund der nötigen starken Verdünnung der Emulsionen für die Messungen und des vergleichsweise geringen Anteils dieser Partikelgröße (> 25 µm) nur eine geringe Anzahl von Partikeln bei der Messung erfasst wurde.

Vergleicht man die mittels Laserdiffraktometrie bestimmten Teilchengrößenverteilungen von den vier ausgewählten M500-Siliconölemulsionen direkt mit den mittels SPOS-Messungen detektierten Partikelanzahlverteilungen, ist deutlich zu erkennen, dass mit der Laserdiffraktometrie nicht alle großen Partikel erfasst werden (Abb. 4-5).

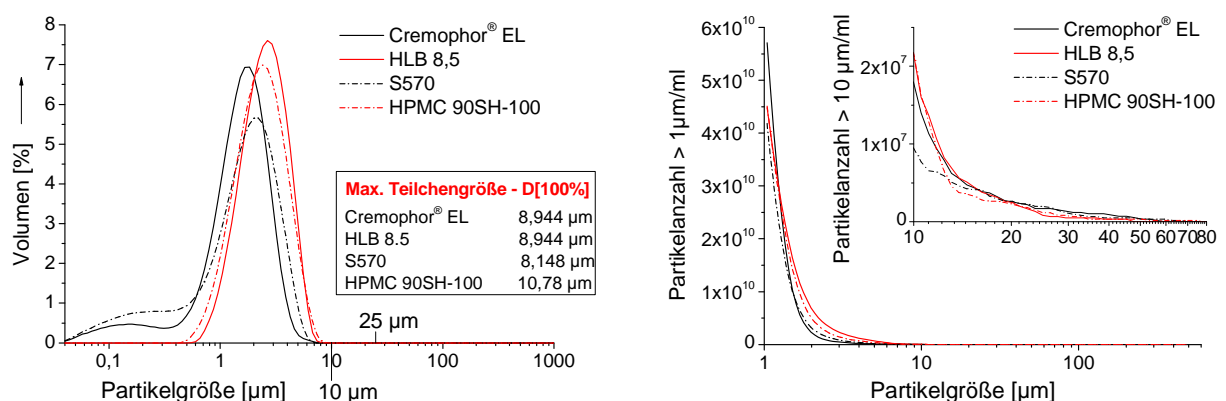


Abb. 4-5: Vergleich der Partikelgrößenverteilung und Partikelanzahlverteilung von vier ausgewählten M500-Siliconölemulsionen (vA); links: Partikelgrößenverteilung (LD); rechts: Partikelanzahlverteilung (SPOS)

Bei den Partikelgrößenverteilungen, die mittels Laserdiffraktometrie bestimmt wurden, sind nur bei der HPMC-stabilisierten Emulsion Teilchen größer als 10 µm gemessen worden (größter gemessener Partikel $D[100\%]=10,78\text{ }\mu\text{m}$). Dagegen ist jedoch bei der Charakterisierung der Emulsionen mittels SPOS bei allen Zubereitungen ein kleiner Anteil von Partikeln zu erkennen, die größer als 10 µm sind (Anteil $< 0,05\text{ }\%$). Diese Untersuchungen bestätigen Berichte aus der Literatur, dass mittels SPOS im Vergleich zur Laserdiffraktometrie eine genauere Bestimmung des Anteils der großen Partikel in Emulsionszubereitungen möglich ist (225,262).

Interessant ist auch, dass die M500-Siliconölemulsionen, die mit den drei nichtionischen Emulgatoren Cremophor® EL, Poloxamer 188 und Tween® 80 hergestellt wurden, im Gegensatz zu den entsprechenden M10-Formulierungen eine bessere Stabilität der Partikelgrößenverteilungen nach der Dampfsterilisation zeigten.

Die Instabilität der betreffenden M10-Siliconölemulsionen könnte auf die höhere Diffusionsgeschwindigkeit der kleineren, niedrig viskoserer Partikel im Vergleich zu den M500-Partikeln während des Autoklavierprozesses zurückzuführen sein. Aufgrund der erhöhten Beweglichkeit der M10-Siliconölteilchen kommt es zur vermehrten Kollision der Partikel. Die geringere Viskosität des Siliconöls M10 bedingt auch eine höhere Deformierbarkeit und folglich eine geringere mechanische Stabilität der Emulsionstropfen. Diese beiden Effekte führen vermutlich zu einer erhöhten Koaleszenzwahrscheinlichkeit der M10-Siliconöltröpfchen beim Autoklavieren. Die höher viskosen Partikel der M500-Emulsionen sind dagegen weniger beweglich und kollidieren folglich seltener. Trotz der Überschreitung des Cloud-Points der Stabilisatoren und einer möglichen Schädigung des Grenzflächenfilmes bei der Sterilisation konnte bei den M500-Emulsionen mit geringer Teilchengröße ($D_{50} < 3\text{ }\mu\text{m}$) nur bei den Poloxamer 188-stabilisierten Zubereitungen teilweise eine Koaleszenz der Partikel beobachtet werden.

Für die Herstellung der M10- und M500-Emulsionen wurden die gleichen Emulgatormengen zur Stabilisierung eingesetzt. Die M10-Emulsionen wiesen jedoch aufgrund der geringeren Viskosität des Siliconöls kleinere Partikel auf. Für die Stabilisierung der M10-Tröpfchen ist somit aufgrund der größeren Grenzfläche mehr Emulgator nötig als bei den größeren M500-Tröpfchen. Folglich ist bei den M500-Emulsionen ein größerer Anteil an freiem Emulgator in der wässrigen Phase vorhanden, was ebenfalls zu einer höheren Stabilität der M500-Tröpfchen während des Autoklavierens beiträgt.

In Abb. 4-6 ist nochmals deutlich zu erkennen, dass die Autoklavierinstabilität bei bestimmten Emulgatoren von der Viskosität des Siliconöls, das zur Herstellung der Emulsion^c verwendet wurde, abhängig ist. Bereits bei einer M100-Emulsion, die mit Cremophor® EL stabilisiert wurde, tritt wie auch bei den M500- und M1000-Emulsionen keine signifikante Zunahme der Partikelgröße mehr auf.

^c Die Emulsionen entsprechen denen aus Kapitel 4.1.2.1 (Einfluss der Viskosität des Siliconöls). Eine Fraktion der Emulsionen wurde nach der Herstellung autoklaviert.

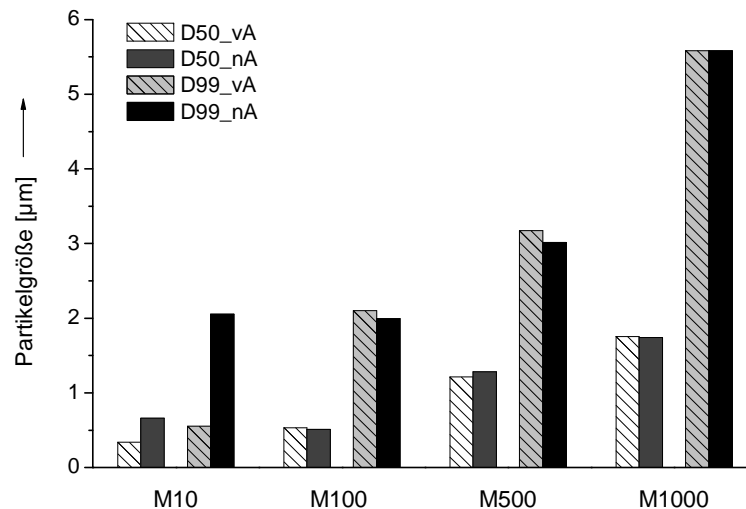


Abb. 4-6: Vergleich der D50- und D99-Werte von Cremophor® EL-stabilisierten Emulsionen in Abhängigkeit von der Siliconölviskosität vor und nach dem Autoklavieren

Das Partikelgrößenwachstum der Span® 80- und Belsil® DMC 6031-stabilisierten M500-Emulsionen beim Autoklavieren im Vergleich zu den entsprechenden, stabilen M10-Emulsionen ist damit jedoch nicht zu erklären (siehe auch Abb. 4-3). Beide Emulgatoren scheinen aufgrund der vergleichsweise großen Partikel der Formulierungen nicht optimal zur Stabilisierung von Siliconölemulsionen geeignet zu sein. Dies lässt vermuten, dass der Grenzflächenfilm nur eine geringe mechanische Stabilität aufweist. Aufgrund der relativ großen Masse der Partikel der M500-Emulsionen könnte die Wahrscheinlichkeit der Koaleszenz beim Autoklavieren zunehmen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der Emulgator einen deutlichen Einfluss auf die Autoklavierstabilität der Emulsionen hat. Aber auch die Viskosität des formulierten Siliconöls beeinflusst die Veränderung der Partikelgrößenverteilung der Emulsionen nach der Hitzesterilisation. Ausgewählte Siliconölemulsionen können autoklaviert werden und stehen somit als sterile Zubereitungen für die Durchführung von in-vivo- und in-vitro-Versuchen zur Verfügung. Keine Zunahme der Partikelgröße nach dem Autoklavieren konnten für die M10- und M500-Emulsionen beobachtet werden, die mit dem Phospholipid S100, dem Zuckerester S570 sowie dem Emulgatorgemisch von Span® 80 und Tween® 80 (HLB 8,5) stabilisiert wurden.

Ein positiver Einfluss des Autoklavierprozesses auf die Partikelgröße von Tween® 80-stabilisierten Siliconölemulsionen, wie er von Sachse et. al (238) beschrieben wurde, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Dieser trat jedoch ausgeprägter in Emulsionen, die mit höher viskosen Siliconölen (M1000 und M5000) formuliert wurden, sowie nach einer längeren Autoklavierdauer (60 min) auf.

Ergänzende Untersuchungen zur Autoklavierstabilität von Zuckerester-, Hydroxypropylmethylcellulose- und PEG/PPG-Dimeticon-stabilisierten Emulsionen

Die M10- und M500-Siliconölemulsionen wurden mit einer großen Anzahl an Emulgatoren hergestellt. Für die weiterhin geplanten Untersuchungen und den angestrebten therapeutischen Einsatz sollten, wie bereits erwähnt, Emulsionen mit einer geringen Partikelgröße sowie einer guten Autoklavier- und Lagerstabilität formuliert werden. Ergänzend zu den bereits vorgestellten Emulgatoren wurden weitere Zuckerester, verschiedene Hydroxypropylmethylcellulosen sowie eine gereinigte Form des Wacker Belsil® DMC 6031 zur Stabilisierung der Emulsionen eingesetzt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird der Einfluss dieser Emulgatoren auf die Partikelgröße und die Autoklavierstabilität der M10- und M500-Emulsionen erst im folgenden Abschnitt kurz dargestellt.

Zuckerester

Neben dem Zuckerester S570 wurden fünf weitere Saccharoseester in einer Konzentration von 2 % zur Formulierung der 35%igen M10- und M500-Siliconölemulsionen unter Standardbedingungen eingesetzt. Die verwendeten Saccharoseester unterschieden sich in ihrem HLB-Wert und der veresterten Fettsäurekomponente (siehe Tab. 3-4). In Abb. 4-7 ist der Median der Teilchengrößenverteilung der entsprechenden Zubereitungen vor und nach dem Autoklavieren dargestellt.

Es war möglich, mit allen eingesetzten Saccharoseestern Siliconölemulsionen zu formulieren, die sich jedoch deutlich hinsichtlich ihrer Partikelgrößen unterschieden. Die ölsäurehaltigen Stabilisatoren (O170 und O1570) erwiesen sich als wenig geeignet. Die Herstellung der Emulsionen mit dem Saccharoseester O170 führte nur zu sehr großen Siliconölpartikeln. Dagegen zeigten die Formulierungen mit O1570 einen vergleichsweise geringen Median-Wert, aber eine ausgeprägte Autoklavierinstabilität. Die M10-Emulsionen, die mit den weiteren Laurin-, Myristin- und Stearinsäure-haltigen Saccharoseestern hergestellt wurden, verhielten sich ähnlich hinsichtlich ihrer Teilchengröße und besaßen eine gute Autoklavierstabilität.

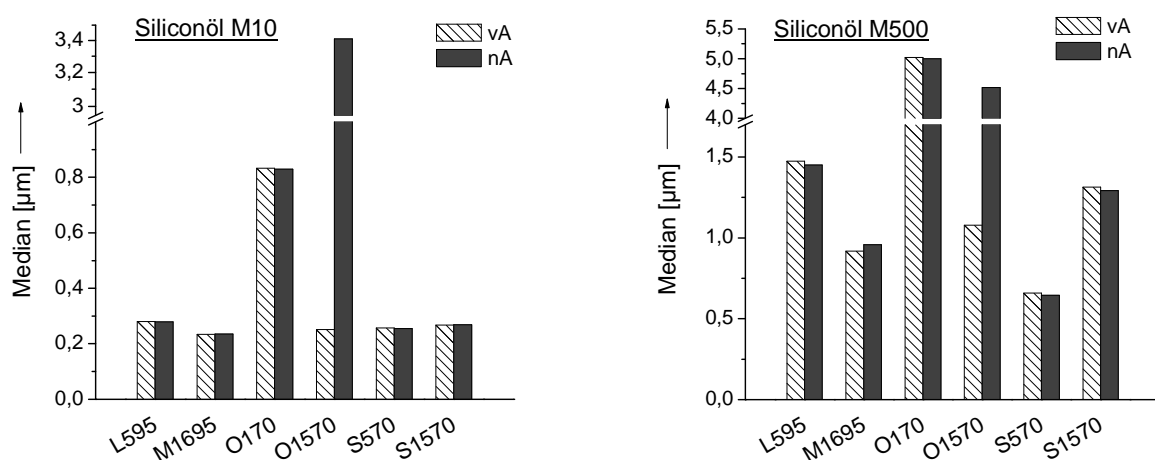


Abb. 4-7: Vergleich der Mediane der Teilchengrößenverteilungen der Saccharoseester-stabilisierten Siliconölemulsionen vor und nach dem Autoklavieren (vA und nA); links: Siliconöl M10, rechts: Siliconöl M500

Interessant ist, dass Siliconöl/Wasser-Emulsionen auch mit sehr lipophilen Saccharoseestern wie S570 und L595 (HLB-Wert 5) formuliert werden konnten und dabei sogar eine geringe Partikelgröße und keine Veränderung nach dem Autoklavieren aufwiesen. In später vorgestellten Untersuchungen (siehe Kapitel 4.1.4.1) konnte gezeigt werden, dass die Partikel der S570-stabilisierten M500-Emulsion eine deutlich negative Ladung tragen (pH 7,4 → Zetapotential -58,7 mV). Diese negative Ladung ist möglicherweise die Ursache für die bessere Stabilität der Emulsionen mit dem Saccharoseester S570 im Vergleich zu der instabilen M500-Formulierung mit dem ebenfalls lipophilen Emulgator Span® 80 (HLB 4,3; Zetapotenzial der Span® 80-haltigen Emulsion wurde nicht bestimmt).

Für alle weiteren Untersuchungen wurde der Saccharoseester S570 aufgrund der geringen Teilchengröße der S570-Emulsionen sowie deren guter Autoklavierstabilität ausgewählt.

Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)

Der Einsatz von Hydroxypropylmethylcellulose zur Stabilisierung von Emulsionen mit mittelkettigen Triglyceriden als Ölphase wurde bereits intensiv untersucht (34,263,264). Auch unterschiedlich viskose Siliconöle wurden von Yonekura und Kawaguchi et al. schon mittels HPMC als O/W-Emulsionen formuliert (248,265). Diese in der Literatur beschriebenen HPMC-Siliconölemulsionen zeigten eine ansprechende Stabilität. Außerdem weist HPMC als Stabilisator nur eine geringe Toxizität auf, was im Hinblick auf die geplanten in-vivo- und in-vitro-Studien von Bedeutung ist. Weiterhin wird HPMC bereits in kommerziellen Simeticon-Präparaten (Sab Simplex® (266); siehe auch Anhang A2) eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss von zwei unterschiedlich substituierten Hydroxypropylmethylcellulosen (siehe Tab. 3-2) auf die Partikelgröße der M10- und M500-Emulsionen (35 % Siliconöl) und deren Autoklavierstabilität beurteilt. Die Konzentration an HPMC in den Emulsionen betrug 0,5 %. Bei einem höheren Anteil an Stabilisator waren die Emulsionen zu viskos für die Homogenisation unter Standardbedingungen.

Eine Zunahme der Partikelgröße war nach dem Autoklavieren nur bei der mit HPMC 60SH-50 stabilisierten M10-Siliconölemulsion (n=1) zu beobachten (Abb. 4-8, *links*). Alle anderen untersuchten Zubereitungen waren stabil. Die auftretende Instabilität könnte einerseits mit der geringeren Viskosität der wässrigen Phase der HPMC 60SH-50-haltigen Emulsion (2 % Lösung – 50 mPa·s) im Vergleich zur HPMC 90SH-100-haltigen Emulsion (2 % Lösung – 100 mPa·s) begründet werden. Aufgrund der geringeren Viskosität der äußeren Phase sind die Siliconöltröpfchen beweglicher und koaleszieren schneller. Wollenweber et al. konnten außerdem bereits bei der Stabilisierung mittelkettiger Triglycerid-Partikel zeigen, dass HPMC mit dem Substitutionstyp 2208 (90SH-100) stabilere Grenzflächenfilme ausbildet als HPMC 2910 (60SH-50) (34). Die Autoklavierinstabilität der HPMC 60SH-50-haltigen M10-Emulsion ist somit andererseits eventuell durch die schlechtere Stabilisierung der Tröpfchen und die dadurch erhöhte Koaleszenzneigung begründet.

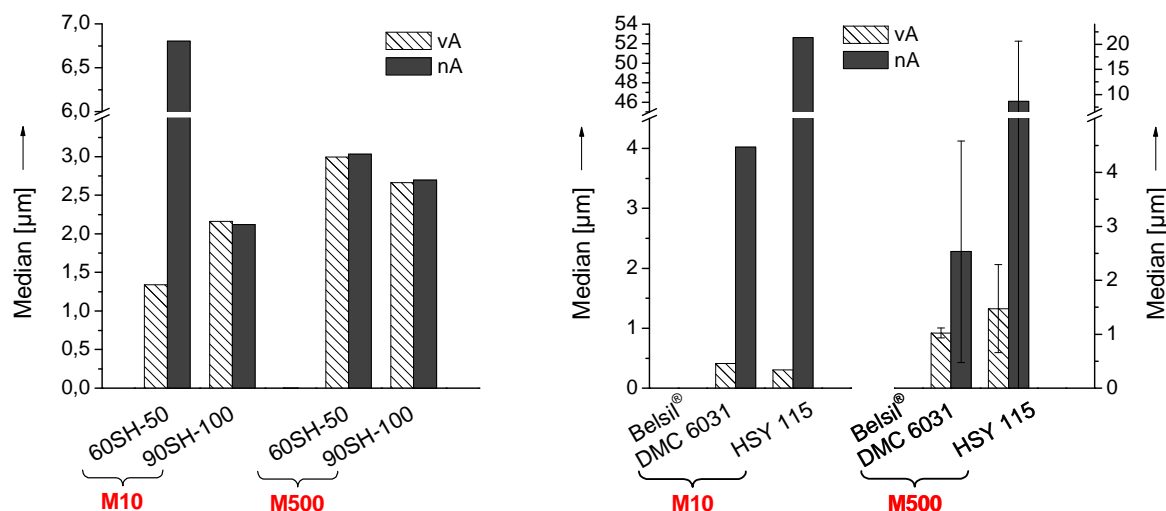


Abb. 4-8: *links:* Einfluss der verwendeten **HPMC** (Metolose®) auf den Median der M10- und M500-Emulsionen (vor und nach dem Autoklavieren (vA und nA); n=1); *rechts:* Vergleich der beiden **PEG/PPG-Dimeticone:** Einfluss von Wacker Belsil® DMC 6031 und HSY 115 auf den Median der M10- und M500-Emulsionen (vA, nA); (M10: n=1, M500/ Belsil® DMC 6031: n=2, M500/ HSY 115: n=3)

Bei den M500-Emulsionen dagegen konnte nur ein geringer Einfluss des Molekulargewichtes bzw. des Substitutionstyps der HPMC beobachtet werden. Beide Formulierungen zeigten keine Zunahme der Partikelgröße nach der Sterilisation. Die HPMC 90SH-100-stabilisierte Zubereitung wies etwas kleinere Partikel auf. Wie bereits oben diskutiert wurde, kann die bessere Autoklavierstabilität der M500-Emulsionen möglicherweise auch auf den höheren Anteil an freiem Stabilisator (HPMC) in den wässrigen Phasen zurückgeführt werden, der aufgrund der größeren Partikel der Formulierungen im Vergleich zu den entsprechenden M10-Emulsionen vorliegt.

Mit beiden eingesetzten HPMC-Typen war es möglich, Siliconölemulsionen zu formulieren, die sich jedoch hinsichtlich ihrer Autoklavierstabilität unterschieden. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen nur die HPMC 90SH-100 zur Stabilisierung der Emulsionen eingesetzt.

PEG/PPG-Dimeticone

Das von Wacker Chemie bezogene PEG/PPG-Dimeticone Belsil® DMC 6031 wurde von der HaemoSys GmbH Jena durch eine Methanolfractionierung gereinigt. Dabei wurden Polyethersiloxane mit gleicher Siliconölkettlänge angereichert. Im Folgenden erfolgt der Vergleich der Partikelgrößen sowie der Autoklavierstabilität der Emulsionen, die mit dem gereinigten PEG/PPG-Dimeticone (bezeichnet als HSY 115) bzw. mit Wacker Belsil® DMC 6031 formuliert wurden. Die untersuchten Emulsionen wurden nur mit 10 % Siliconöl M10 bzw. M500 hergestellt, da bei einem größeren Volumenanteil der Ölphase Probleme bei der Formulierung mit HSY 115 auftraten. Die Herstellung erfolgte unter Standardbedingungen mit einem Emulgatoranteil von 2 %.

Beide M10-Emulsionen wiesen eine ausgeprägte Autoklavierinstabilität auf (Abb. 4-8, *rechts*). Die M500-Emulsionen wurden jeweils in 2 (Belsil® DMC 6031) bzw. 3 Ansätzen (HSY 115) hergestellt und sterilisiert. Bei beiden Emulgatoren war zu beobachten, dass jeweils ein Ansatz nach dem Autoklavieren eine Zunahme der Teilchengröße zeigte, der andere Herstellungsansatz war stabil. Die HSY 115-M500-Emulsion wurde in 3 weiteren Ansätzen formuliert, die alle nach dem Autoklavieren eine deutliche Phasentrennung aufwiesen (nicht in Abb. 4-8 dargestellt). Die Instabilität dieser Emulsionen als Folge des Autoklavierprozesses kann mit dem niedrigen Cloud Point der beiden Stabilisatoren begründet werden. Der Cloud Point für HSY 115 wurde experimentell in einer 1%igen wässrigen Lösung bei $34,1^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ ermittelt (Cloud Point - Belsil® DMC 6031: $36,6^{\circ}\text{C} \pm 0,6^{\circ}\text{C}$). Ein deutlicher Unterschied im Emulgierverhalten und der Autoklavierstabilität der beiden PEG/PPG-Dimeticone ist also nicht zu erkennen. Das Belsil® DMC 6031 scheint für die Stabilisierung der untersuchten Siliconölemulsionen etwas besser geeignet zu sein, da hier eine geringere Autoklavierinstabilität zu beobachten war. Dennoch sind beide Emulgatoren nicht die bevorzugte Wahl für die Herstellung der Siliconölemulsionen.

4.1.2.4 Einfluss der Emulgatorkonzentration

Die Partikelgröße und die Stabilität von O/W-Emulsionen werden nicht nur durch die Herstellungsbedingungen und die Wahl des Emulgator- bzw. des Öltyps, sondern auch durch die Emulgatorkonzentration beeinflusst (227,244,245).

Der Einfluss der Konzentration des hydrophilen Tween® 80 in der wässrigen Phase sowie des lipophilen Span® 80, dispergiert in der inneren Phase, auf die Teilchengröße einer M100-Siliconölemulsion (35 % M100) wurde untersucht. Die Herstellung der Emulsionen erfolgte unter Standardbedingungen. Beide Emulgatoren wurden getrennt eingesetzt.

In Abb. 4-9 ist die Abhängigkeit der D50- und D99-Werte der Emulsionen von der eingesetzten Emulgatorkonzentration dargestellt. Bei den Tween® 80-stabilisierten Emulsionen ist zu Beginn mit steigender Konzentration des Stabilisators eine deutliche Abnahme der Teilchengrößen zu beobachten. Ab einem Gehalt von 5 % Tween® 80 in der äußeren Phase kommt es nur noch zu einer geringeren Reduktion des D50- bzw. des D99-Wertes. Die zunehmende Konzentration an Tween® 80 (bis 5 %) führt zunächst zu einer schnelleren Stabilisierung der neu geschaffenen Grenzfläche der Tröpfchen (267). Aufgrund der höheren Emulgatorkonzentration stehen mehr freie Emulgatormoleküle an der Grenzfläche zur Verfügung und adsorbieren an den neu gebildeten Öltröpfchen. Durch die schnellere Stabilisierung der Tröpfchen (infolge des höheren Emulgatoranteils) werden diese besser vor Koaleszenz geschützt. Da jedoch nur die Tween® 80-Konzentration und nicht der Energieeintrag bei der Homogenisation erhöht wurde, ist trotz einer weiteren Zunahme der Emulgatorkonzentration (> 5 % Tween® 80) keine deutliche Reduktion der Partikelgröße mehr zu beobachten.

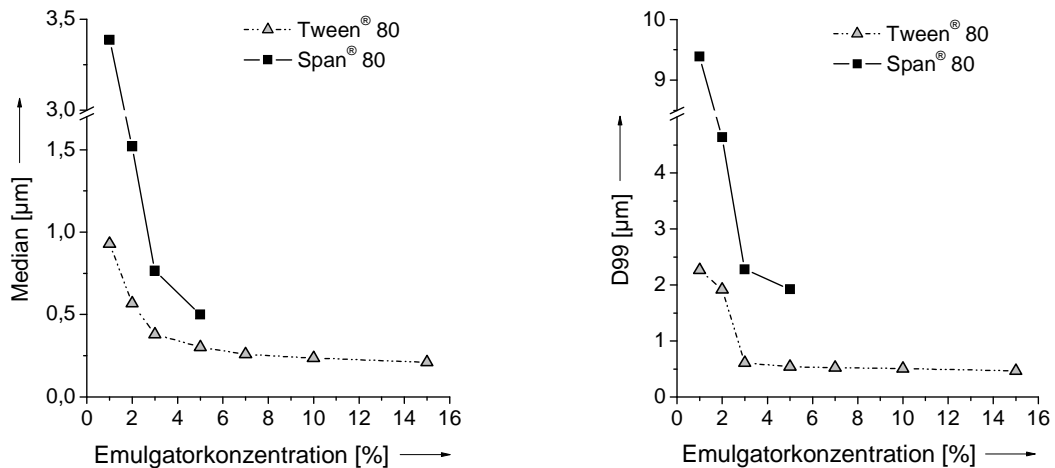


Abb. 4-9: Einfluss der Emulgatorkonzentration (Tween® 80 bzw. Span® 80) auf den Median-Wert (*links*) und den D99-Wert (*rechts*) einer 35%igen M100-Siliconölemulsion (vor dem Autoklavieren); Bestimmung der Teilchengröße mittels Laserdiffraktometrie

Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen vermuten, dass ab einer Tween® 80-Konzentration von 5 % die neu gebildete Grenzfläche ausreichend stabilisiert ist und die Partikel vor Koaleszenz geschützt sind. Eine weitere Erhöhung der Emulgatorkonzentration hat somit keinen signifikanten Einfluss mehr auf die Größe der Siliconöltröpfchen, da infolge des gleich bleibenden Energieeintrages bei der Homogenisation keine weitere Zerkleinerung der Siliconöltröpfchen erfolgen kann (27,239,244).

Alle Tween® 80-stabilisierten M100-Emulsionen waren über einen Lagerungszeitraum von einem Jahr stabil. Im Gegensatz zu der M10-Emulsion wiesen die Formulierungen mit dem Siliconöl M100 und Tween® 80 als Stabilisator keine Autoklavierinstabilität auf (siehe Kapitel 4.1.2.3). Die M100-Emulsionen mit einem Emulgatoranteil von ≥ 5 % Tween® 80 zeigten sogar kleinere Partikel (10 % Tween® 80: $D_{50}=0,24 \mu\text{m}$) als die M10-Emulsionen mit 2 % Tween® 80 ($D_{50}=0,31 \mu\text{m}$) in der wässrigen Phase. Es konnte wie bereits bei den Cremophor® EL-haltigen Siliconölemulsionen gezeigt werden, dass trotz eines Cloud Points $< 100^\circ\text{C}$ von Tween® 80 durch eine höhere Viskosität der inneren Phase (Vergleich Siliconöl M10 - M100) keine Zunahme der Partikelgröße nach dem Autoklavieren mehr auftrat.

Span® 80 war nur bis zu einer Konzentration von 5 % mit dem Siliconöl M100 emulgierbar. Bei höheren Konzentrationen des Emulgators kam es zur Ausflockung während der Voremulgierung mittels UltraTurrax.

Die Erhöhung des Emulgatoranteils hat bei dem lipophilen Emulgator Span® 80 eine stärkere Teilchengrößenreduktion zur Folge. Eine Zunahme der Partikelgröße der Span® 80-stabilisierten Emulsionen nach dem Autoklavieren war nicht zu beobachten. Jedoch zeigten alle Zubereitungen, mit Ausnahme der M100-Siliconölemulsion mit 5 % Span® 80, nach 4-12 Wochen eine irreversible Phasentrennung. In der 5%igen Span® 80-Emulsion konnte auch ein Jahr nach Lagerung keine Zunahme der D50- und D99-Werte gemessen werden. Durch die Erhöhung der Konzentration des

lipophilen Emulgators auf 5 % konnte also nicht nur die Teilchengrößenverteilung, sondern auch die Lagerstabilität beeinflusst und verbessert werden.

Trotz des positiven Einflusses der erhöhten Emulgatorkonzentration auf die Stabilität und die Partikelgröße der M100-Emulsion wurde für die nichtionischen Stabilisatoren ein Emulgatoranteil von 2 % beibehalten. Höhere Konzentrationen könnten trotz der guten Verträglichkeit der Emulgatoren zu Reizungen und toxischen Effekten in den in-vitro- und in-vivo-Versuchen führen (250).

4.1.3 Lagerungsstabilität

Die in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Siliconölemulsionen wurden nach der Herstellung, dem Autoklavieren und der Charakterisierung bei Raumtemperatur gelagert, um im weiteren Verlauf die Lagerstabilität der verschiedenen Zubereitungen zu beurteilen. Von den ausgewählten Emulsionen wurden autoklavierte (nA) und nicht autoklavierte (vA) Proben untersucht, um auch den Einfluss des Autoklavierprozesses auf die Lagerstabilität zu bewerten. In der Regel wurde von den autoklavierten Siliconölemulsionen nach 4, 8, 12, 24 und 52 Wochen eine Probe entnommen und mittels Laserdiffraktometrie charakterisiert. Bei den nicht autoklavierten Zubereitungen wurden nach 24 und 52 Wochen die Teilchengrößenverteilungen bestimmt. War jedoch bei der entsprechenden Probe nach dem Autoklavieren (nA) bereits vor der Durchführung der 24 Wochen-Messung eine Zunahme der Partikelgröße festzustellen, wurde die vA-Probe schon zu einem früheren Zeitpunkt vermessen. Ein Überblick über die Lagerstabilität der autoklavierten Proben ist in Tab. 4-4 bzw. über die Entwicklung der Partikelgröße (D50- und D99-Wert) der autoklavierten und nicht autoklavierten Proben über einen Lagerungszeitraum von einem Jahr im Anhang A 1 (nur jeweils ein Herstellungsansatz aufgeführt) zu finden.

Mit Cremophor[®] EL, Tween[®] 80 und dem Emulgatorgemisch HLB 8,5 wurden je vier verschieden viskose Siliconölemulsionen (M10, M100, M500, M1000) in Bezug auf ihre Lagerstabilität beurteilt. Von diesen Emulsionen wurden je 2 Chargen (vA und nA) untersucht, die alle auch nach 52 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur keine Zunahme der Partikelgröße zeigten (Tab. 4-4; Anhang A1). Nur eine Charge der nicht autoklavierten Cremophor[®] EL-stabilisierten M10-Siliconölemulsionen wies nach 52 Wochen eine starke Zunahme des D99-Wertes auf. Bei dem 2. Herstellungsansatz der Cremophor[®] EL-stabilisierten Siliconölemulsionen konnte keine Instabilität einer Emulsion festgestellt werden, auch die Formulierung mit dem Siliconöl M10 (vA) wies kein Partikelgrößenwachstum nach 52 Wochen auf. Die auftretende Instabilität konnte somit nicht bestätigt werden. Prinzipiell wäre eine Zunahme der Partikelgröße eher bei der autoklavierten M10-Probe zu erwarten gewesen, da hier aufgrund der Autoklavierinstabilität (siehe Kapitel 4.1.2.3) bereits größere Partikel vorliegen, die kinetisch instabiler sind.

Auch mit Span[®] 80 wurden die vier verschieden viskosen Siliconöle formuliert (n=1). Jedoch zeigte hier keine der untersuchten Zubereitungen eine ansprechende Stabilität über einen Lagerungszeitraum von einem Jahr. Bei allen autoklavierten Proben war bereits spätestens nach 12 Wochen, bei allen

nicht autoklavierten Proben erst nach 24 Wochen, eine irreversible Phasentrennung zu beobachten. Die Stabilität der Emulsionen war stark abhängig von der Viskosität des verarbeiteten Siliconöls und somit von der Partikelgröße. Die M500-Emulsion zeigte nach dem Autoklavieren einen deutlichen Anstieg der Partikelgröße und nach 4 Wochen Lagerung eine irreversible Phasentrennung, ähnlich wie die M1000-Emulsion, die bereits nach dem Autoklavieren eine deutliche Ölschicht an der Oberfläche der Zubereitung aufwies. Die niedrigviskoserem Siliconölemulsionen (M10 und M100; vA) waren über einen längeren Zeitraum stabil, zeigten jedoch auch spätestens nach 24 Wochen Lagerung eine irreversible Phasentrennung. Das Autoklavieren der M10- und M100-Siliconölemulsionen hatte im Fall der Span[®] 80-stabilisierten Emulsionen einen negativen Einfluss auf deren Stabilität. Die autoklavierte M10-Emulsion zeigte bereits nach 4 Wochen eine ausgeprägte Instabilität, dagegen war bei der nicht autoklavierten Probe erst nach 24 Wochen eine Zunahme der Partikelgröße zu beobachten.

Für alle weiteren untersuchten Emulgatoren wurden nur noch die Lagerungsstabilität für die M10- und M500-Siliconölemulsionen (vA und nA) beurteilt (n=1).

Die Partikelgrößen der Phospholipid S100, Poloxamer 188 und mit beiden HPMC-Typen stabilisierten M10- und M500-Siliconölemulsionen wiesen auch ein Jahr nach Herstellung weder bei den autoklavierten noch bei den nicht sterilisierten Zubereitungen eine signifikante Zunahme auf.

Im Gegensatz zu den letztgenannten Emulgatoren zeigte die Wacker Belsil[®] DMC 6031-haltige M500-Zubereitung (nA) bereits nach 4 Wochen eine Zunahme des D99-Wertes, der aber im weiteren Untersuchungszeitraum nicht weiter anstieg. Der Median-Wert der M500-Emulsion (nA) war jedoch konstant. Aufgrund des beobachteten Partikelgrößenwachstums der M500-Emulsion, die mit Belsil[®] DMC 6031 stabilisiert wurde, könnte eine kürzere Lagerungsstabilität auftreten als bei anderen Zubereitungen (z.B. mit Tween[®] 80 oder Cremophor[®] EL). Nach einem Jahr war jedoch noch keine irreversible Phasentrennung sichtbar. Die entsprechenden M10-Emulsionen (vA und nA) waren über den untersuchten Lagerungszeitraum stabil.

Es konnte gezeigt werden, dass Wacker Belsil[®] DMC 6031 nicht nur als Co-Emulgator, wie in der Literatur beschrieben (205), eingesetzt werden kann, sondern auch ohne weitere Zusätze eine O/W-Emulsion über einen begrenzten Zeitraum stabilisieren kann. Möglicherweise treten jedoch aufgrund des geringen Cloud-Points des Emulgators ($36,6 \pm 0,6$ °C) Probleme bei der Lagerung der Emulsionen bei höheren Temperaturen auf. Shinoda und Arai (268) konnten zeigen, dass der Cloud-Point eines Emulgators mit der Phaseninversionstemperatur korreliert. Da O/W-Emulsionen stabil sind, wenn die Phaseninversionstemperatur 20-65°C über der Lagerungstemperatur liegt (269), könnten Stabilitätsprobleme der Belsil[®] DMC 6031-stabilisierten Emulsionen bei höheren Temperaturen auftreten.

Weiterhin wurden die M10- und M500-Siliconölemulsionen, deren Herstellung mit den sechs verschiedenen Saccharoseestern erfolgte, hinsichtlich ihrer Lagerstabilität beurteilt. Eine irreversible Phasentrennung bzw. eine deutliche Zunahme der Partikelgröße war bei den Emulsionen zu beobachten, die mit den ölsäurehaltigen Saccharoseestern (O170 und O1570) stabilisiert wurden.

Tab. 4-4: Überblick über die Lagerstabilität der unterschiedlich stabilisierten, autoklavierten Siliconölemulsionen (Siliconölgehalt 35%); +: stabil, Schwankung der bestimmten Partikelgröße um ± 10 % ausgehend von der Partikelgröße nach dem Autoklavieren (nA); \uparrow : Zunahme der Partikelgröße > 10 % ausgehend von der Partikelgröße nA; (/) keine Partikelgrößenmessung vorhanden; (\uparrow): Ausreißer-Wert; Zusammensetzung der Emulsionen siehe auch Tab. 4-1

Emulgator	Stabilität nach				
	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	24 Wochen	52 Wochen
Cremophor® EL					
M10	+	+	+	+	+
M100	+	+	+	+	+
M500	+	+	+	+	+
M1000	+	+	+	+	+
Tween® 80					
M10	+	+	+	+	+
M100	+	+	+	+	+
M500	+	+	+	+	+
M1000	+	+	+	+	+
Span® 80					
M10	↑	↑	Phasentrennung nach 12 Wochen		
M100	↑	Phasentrennung nach 8 Wochen			
M500	Phasentrennung nach 4 Wochen				
M1000	Phasentrennung nach dem Autoklavieren				
HLB 8,5 (Span® 80/Tween® 80)					
M10	+	+	+	+	+
M100	+	+	+	+	+
M500	+	+	+	+	+
M1000	+	+	+	+	+
Poloxamer 188					
M10	+	+	+	+	+
M500	(↑)	+	+	+	+
Phospholipid S100					
M10	+	+	+	+	+
M500	+	+	+	+	+
Wacker Belsil® DMC 6031					
M10	+	+	+	+	+
M500	↑	↑	+	↑	↑
Zuckerester L595					
M10	+	+	+	+	+
M500	Pilzwachstum				
Zuckerester M1695					
M10	+	+	+	+	+
M500	+	+	+	Pilzwachstum	
Zuckerester O170					
M10	+	↑	Phasentrennung nach 12 Wochen		
M500	Phasentrennung nach 4 Wochen				
Zuckerester O1570					
M10	+	↑	/	+	Phasen- trennung
M500	/	/	/	↑	

Fortsetzung Tab. 4-4

Emulgator	Stabilität nach				
	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	24 Wochen	52 Wochen
Zuckerester S570					
M10	+	+	+	+	+
M500	+	+	+	Pilzwachstum	
Zuckerester S1570					
M10	+	+	+	+	+
M500	+	↑	↑	↑	↑
HPMC 60SH-50					
M10	+	+	+	+	+
M500	+	+	+	+	+
HPMC 90SH-100					
M10	+	+	+	+	+
M500	+	+	+	+	+

Mit Ausnahme der nicht autoklavierten O1570-stabilisierten M500-Siliconölemulsion (vA) zeigten alle anderen Formulierungen mit diesen Emulgatoren eine irreversible Phasentrennung (siehe Tab. 4-4). Ein Einfluss des Autoklavierprozesses auf die Lagerstabilität ist anhand der O170-stabilisierten M10-Siliconölemulsion zu erkennen (siehe Anhang A 1, Tab. A1-1). Die nicht autoklavierte Probe war im Gegensatz zur autoklavierten Emulsion, die bereits nach 8 Wochen eine Zunahme der Partikelgröße zeigte, über einen Zeitraum von 24 Wochen stabil.

Die weiteren in Tab. 4-4 aufgeführten Saccharoseester-Formulierungen wiesen keine irreversible Phasentrennung auf. Eine Ausnahme stellte die L595-M10-Emulsion (vA) dar, die bereits nach 4 Wochen eine deutliche Siliconölschicht an der Oberfläche zeigte. Die Partikelgröße dieser Emulsion wurde im weiteren Verlauf nicht mehr bestimmt. Die autoklavierte Probe dagegen war über einen Lagerungszeitraum von einem Jahr stabil.

Außerdem war bei einigen Siliconölemulsionen, die mit den Saccharoseestern stabilisiert wurden, eine deutlich makroskopisch erkennbare, mikrobielle Kontamination zu beobachten. In Abb. 4-10 ist das Pilzwachstum am Boden einer Injektionsflasche zu sehen, in der die Lagerung der Emulsionen erfolgte. Dieses Pilzwachstum trat sowohl in den nicht autoklavierten wie auch in den autoklavierten Proben auf, da die sterilen Emulsionen zur Probenentnahme geöffnet wurden und somit eine mikrobielle Kontamination nicht auszuschließen war. Wurde ein solches Pilzwachstum wie in Abb. 4-10 festgestellt, wurde die Probe nicht mehr weiter vermessen und entsorgt.

Interessant ist, dass das Pilzwachstum bei den M10-Siliconölemulsionen nur bei den nicht autoklavierten Proben, bei den M500-Siliconölemulsionen dagegen nur bei den autoklavierten



Abb. 4-10: Pilzwachstum am Flaschenboden einer gelagerten M500-Siliconölemulsion, stabilisiert mit dem Zuckerester L595 (nA)

Proben zu beobachten war. Um dieses Phänomen genauer zu klären, weil dies auch durch Zufall entstanden sein könnte, wären weitere Lagerungsversuche notwendig.

Die Saccharose, die ein Bestandteil der hier diskutierten Emulgatoren ist, kann von Mikroorganismen, die in die Emulsion wahrscheinlich durch die Probenentnahme eingebracht wurden, gut metabolisiert werden und bietet somit eine gute Grundlage für deren Vermehrung und Ausbreitung. Um das Problem der mikrobiellen Kontamination der Zubereitungen zu beheben, wäre eine Konservierung dieser Siliconölemulsionen wie in den kommerziellen Präparaten mit beispielsweise Sorbinsäure bzw. Kaliumsorbat sinnvoll.

Die Lagerstabilität der untersuchten Emulsionen wird vom eingesetzten Emulgator sowie bei einigen Zubereitungen auch von der Viskosität des Siliconöls und dem Autoklavierprozess beeinflusst.

Der hydrophobe Emulgator Span[®] 80 ist zur Stabilisierung der diskutierten Siliconölemulsionen nicht geeignet, da diese abhängig von der Viskosität des formulierten Siliconöls eine deutliche Autoklavier- bzw. Lagerinstabilität zeigten. Eine deutliche Instabilität der Emulsionen war auch bei den Formulierungen mit den ölsäurehaltigen Saccharoseestern (O570 und O1570) zu beobachten. Diese Emulgatoren erwiesen sich zum Teil auch schon bei der Untersuchung zum Einfluss des Autoklavierprozesses auf die Partikelgröße der Emulsionen (Kapitel 4.1.2.3) als ungeeignet. Außerdem ist die teilweise auftretende mikrobielle Kontamination der Saccharoseester-haltigen Formulierungen als problematisch zu beurteilen. Die Siliconölemulsionen, die mit dem PEG/PPG Dimeticon Belsil[®] DMC 6031 hergestellt wurden, wiesen nach einem Jahr Lagerung keine irreversible Phasentrennung auf, jedoch war teilweise ein Partikelgrößenwachstum festzustellen. Alle anderen untersuchten Emulsionen (Ausnahme: M10/Cremophor EL/vA und M500/L595/nA) waren über einen Lagerungszeitraum von einem Jahr bei Raumtemperatur stabil. Als besonders geeignet für die Herstellung und Stabilisierung von Siliconölemulsionen erwiesen sich die Emulgatoren Cremophor[®] EL, Tween[®] 80, Poloxamer 188, Lipoid S100, HPMC 90SH-100 sowie das Emulgatormisch von Span[®] 80 und Tween[®] 80 (HLB 8,5), da die entsprechenden Formulierungen eine gute Lagerstabilität und z.T. nur ein geringes Partikelgrößenwachstum nach dem Autoklavieren zeigten, das abhängig war von der Siliconölviskosität der Emulsion.

4.1.4 Stabilität der M500-Siliconölemulsionen in künstlichem Magensaft

Das Ziel der Arbeit ist die Beurteilung des therapeutischen Potenzials der bereits in Kapitel 4.1.2 diskutierten Siliconölemulsionen bei CED. Nach der geplanten oralen Applikation der Emulsionen sind diese jedoch zunächst einem stark sauren pH-Wert im Magen ausgesetzt. Von Interesse war daher die Fragestellung, ob die Emulsionen bereits im Magen eine Instabilität infolge der stark veränderten Umgebungsbedingungen (pH-Wert, Ionenkonzentration) zeigen und so den Darm nur in veränderter Form (Partikelwachstum, Brechen der Emulsion) erreichen. Aus diesem Grund wurde die Partikelgrö-

Benstabilität von ausgewählten M500-Emulsionen im künstlichen Magensaft (Ph. Eur., ohne Pepsin) (211) untersucht.

Für die Untersuchung wurde 1 ml M500-Emulsion mit 50 ml künstlichem Magensaft versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert ($n=2$). Anschließend wurde die Partikelgröße der Emulsionen mittels Laserdiffraktometrie bestimmt. Die Durchführung des Versuches erfolgte in Anlehnung an Zimmermann und Müller (270).

Die Emulsionen hatten einen Siliconölgehalt von 35 % M500 (Ausnahme: HSY 115-stabilisierte Emulsion 10 % M500) und waren mit den entsprechenden Emulgatorkonzentrationen (siehe Tab. 4-1) stabilisiert. Die untersuchten Proben waren mit Ausnahme der Silicontensid-haltigen Zubereitungen alle autoklaviert.

4.1.4.1 Vergleich der M500-Siliconölemulsionen

Die Stabilität der untersuchten M500-Siliconölemulsionen im künstlichen Magensaft ist in Abb. 4-11 dargestellt. Durch den Zusatz der Proben zu dem künstlichen Magensaft wird der pH-Wert (<1) der Emulsionen deutlich verändert. Da außerdem 2 g/l Natriumchlorid im künstlichen Magensaft gelöst sind, steigt die Ionenstärke der Proben stark an.

Mit Ausnahme der Saccharoseester-stabilisierten Zubereitungen zeigte keine der untersuchten Siliconölemulsionen eine Zunahme des Medians nach Zusatz des künstlichen Magensaftes. Im Folgenden werden zunächst nur die stabilen Zubereitungen diskutiert (Zuckerester-stabilisierte Zubereitungen siehe Kapitel 4.1.4.2).

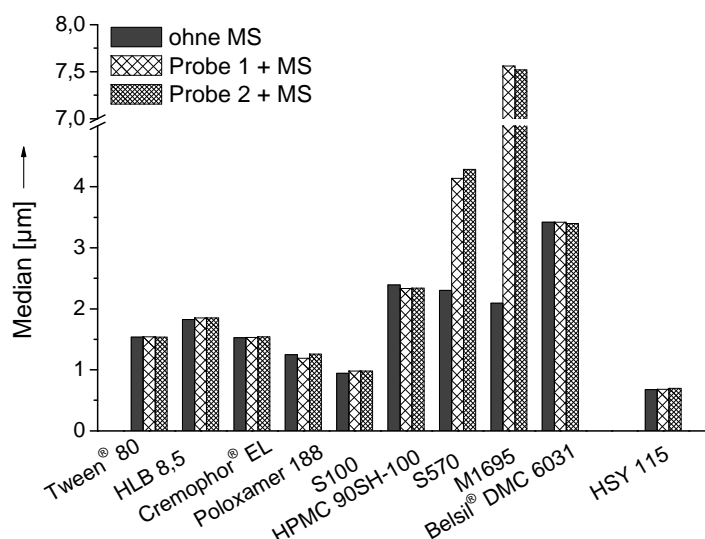


Abb. 4-11: Median-Werte der M500-Siliconölemulsionen ohne und 2 h nach Zusatz des künstlichen Magensaftes (MS) zur Probe (Zusammensetzung der Emulsionen siehe Tab. 4-1; Ausnahme: HSY 115-stabilisierte Emulsion → nur 10 % Siliconöl M500)

Alle untersuchten Emulgatoren sind mit Ausnahme des Lipoids S100 nichtionogene Tenside bzw. Polymere. Nichtionogene Emulgatoren stabilisieren die Emulsion nicht durch elektrostatische Abstoßung, sondern hauptsächlich durch sterische Wechselwirkungen (271).

Von ausgewählten Siliconölemulsionen wurde dennoch das Zetapotenzial bestimmt (siehe Abb. 4-12), das in den untersuchten Proben zwischen -21 mV und +5 mV lag. Dies entspricht mit Ausnahme der HSY 115-Emulsion schwach negativ geladenen Partikeloberflächen. Diese Ladungen würden jedoch nicht ausreichend sein, um die

Emulsionen elektrostatisch zu stabilisieren. Nach Riddick findet erst ab einem Zetapotenzial von -31 mV keine Agglomeration von elektrostatisch stabilisierten Suspensionen mehr statt und ab -41 mV spricht man von einer guten Stabilität infolge einer elektrostatischen Stabilisierung der Dispersionen (272).

Es stellte sich jedoch die Frage, woher die deutlich negativen Ladungen, insbesondere der Partikel die mit Poloxamer 188 und Tween® 80 stabilisiert wurden, herrühren. Für nichtionische Emulgatoren mit Polyoxyethylenketten wird eine spezifische Ionenadsorption in der Literatur beschrieben (31,32,273). Dabei werden Hydroxid-Ionen mit dem Wasserstoffatom an das Sauerstoff-Atom der Etherbrücke der Polyoxyethylengruppe gebunden und verursachen folglich die negative Ladung der Grenzfläche.

Die Erhöhung der Elektrolytkonzentration in der äußeren Phase führte zu einer Abnahme des Zetapotenzials. Der Einsatz einer 0,001 M Natriumchlorid-Lösung als Dispersionsmittel bedingt eine Anreicherung der positiven Natrium-Ionen in der Nähe der negativ geladenen Partikeloberfläche. Dadurch wird die partikelumgebende, diffuse Schicht dünner und ein steilerer Potenzialabfall ist zu beobachten, also ein weniger negatives Zetapotenzial (274). Dennoch zeigten die Emulsionen trotz der erhöhten Ionenkonzentration und des stark sauren pH-Wertes im künstlichen Magensaft keine Zunahme der Partikelgröße, da sie sterisch stabilisiert sind. Der pH-Wert der Proben bei der Messung des Zetapotenzials lag bei Wasser zwischen pH 5,3 und 6,2 bzw. für 0,001 M NaCl-Lösung als Dispersionsmedium zwischen pH 5,2 und 5,5.

Interessanterweise zeigt auch die Emulsion mit dem amphoteren Phospholipid S100 (kationische und anionische Gruppe im Molekül) trotz der elektrostatischen Stabilisierung der O/W-Grenzfläche (Zetapotenzial nicht experimentell bestimmt) nach Zusatz des künstlichen Magensaftes und 2 h Inkubation keine Zunahme der Partikelgröße. Eventuell tritt durch die starke pH-Wert-Änderung

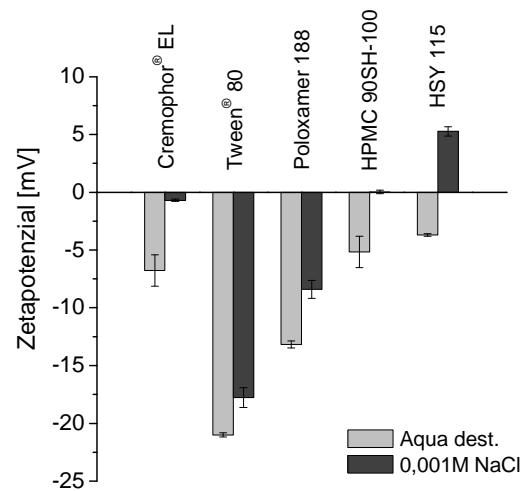


Abb. 4-12: Zetapotenzial ausgewählter M500-Siliconölemulsionen in zwei verschiedenen Dispersionsmedien (n=3)

(erhöhte Protonenkonzentration) eine Umladung an der Partikeloberfläche auf, die die weitere Stabilität der Zubereitung gewährleistet (275).

Eine ausgeprägte Instabilität nach Zusatz des künstlichen Magensaftes war dagegen bei den beiden Saccharoseester-stabilisierten Emulsionen zu beobachten, obwohl auch Saccharoseester nichtionogene Emulgatoren sind. Im folgenden Abschnitt wird diese Instabilität genauer untersucht.

4.1.4.2 Instabilität der S570-Siliconölemulsion

Um die Ursache für die Instabilität der M500-Emulsionen, die mit den Saccharoseestern M1695 und S570 stabilisiert wurden, zu identifizieren, wurde im Folgenden anhand der S570-Siliconölemulsion der Einfluss der Ionenstärke sowie des veränderten pH-Wertes einzeln untersucht.

Die beiden Bestandteile des künstlichen Magensaftes, eine Natriumchlorid-Lösung (2 g/l) sowie 0,1 M HCl, wurden getrennt zu je 2 Proben der S570-Siliconölemulsion gegeben (Vorgehensweise siehe Kap. 4.1.4) und 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde auch hier die Partikelgröße der Emulsionen mittels Laserdiffraktometrie bestimmt.

In Abb. 4-13 (*links*) ist der Einfluss des künstlichen Magensaftes (ohne Pepsin) sowie der einzelnen Komponenten (0,1 M HCl und NaCl-Lösung) auf die Teilchengrößenkurve der S570-haltigen Siliconölemulsion dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die erhöhte Ionenstärke zu keiner Veränderung der Teilchengrößenverteilung führt. Vergleicht man jedoch die Teilchengrößenkurven nach Zusatz des künstlichen Magensaftes bzw. nach Zusatz der 0,1 M HCl, so ist zu beobachten, dass die Teilchengröße der Emulsion nach Inkubation mit beiden Lösungen deutlich zunimmt. Die Ursache für die Instabilität der S570-stabilisierten M500-Siliconölemulsion ist somit nicht die veränderte Ionenstärke, sondern die Abnahme des pH-Wertes.

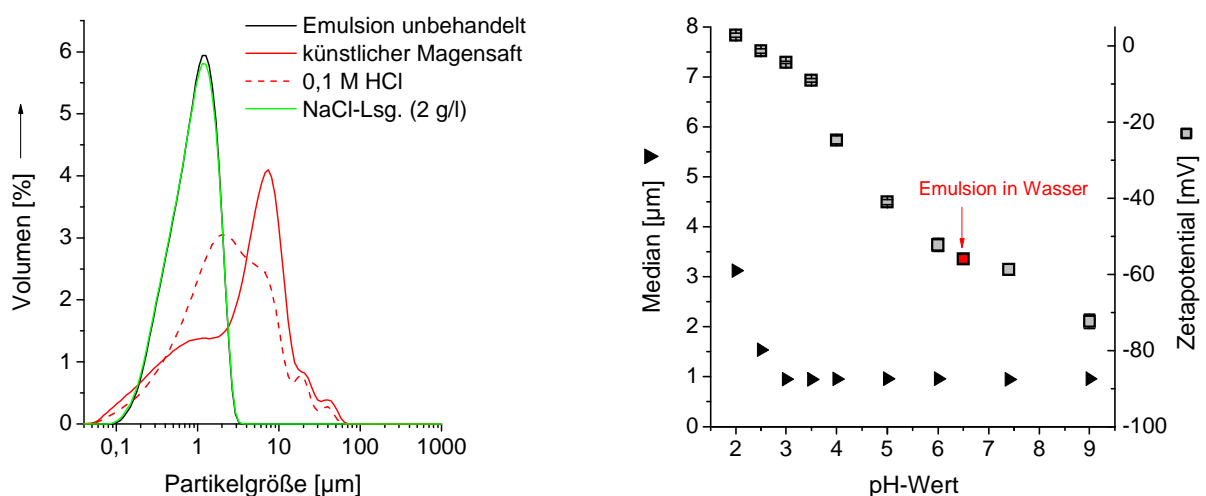


Abb. 4-13: *links:* Veränderung der Teilchengrößenverteilung der S570-stabilisierten M500-Siliconölemulsion nach Zusatz des künstlichen Magensaftes (MS) sowie der beiden Einzelkomponenten 0,1 M HCl und NaCl-Lösung (2 g/l); *rechts:* Einfluss des pH-Wertes der wässrigen Phase (Phosphatpuffer 10 mM) auf die Partikelgröße (Median) und das Zetapotenzial der S570-stabilisierten Siliconöltröpfchen (Siliconöl M500)

Um zu klären, ab welchem pH-Wert eine Zunahme der Partikelgröße der S570-stabilisierten M500-Emulsion auftritt, wurde die Stabilität der Emulsion in verschiedenen 0,01 M Phosphatpuffern (pH 2-9) untersucht. Außerdem wurde von den Phosphatpuffer-Emulsion-Mischungen das Zetapotenzial bestimmt. Hornig et al. konnten bereits für Nanopartikel aus Celluloseestern und Dextranen zeigen, dass mit abnehmendem pH-Wert auch der Betrag des negativen Zetapotenzials kleiner wird (276,277). Als Folge des weniger negativen Zetapotenzials kam es in diesen Studien zur Agglomeration der Nanopartikel.

In Abb. 4-13 (*rechts*) ist die Abhängigkeit des Zetapotenzials und der Partikelgröße der S570-stabilisierten M500-Emulsion vom pH-Wert dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass auch hier mit abnehmendem pH-Wert das Zetapotenzial weniger negativ wird. Die negative Ladung der Partikeloberfläche wird durch die steigende Konzentration an Protonen neutralisiert. Dies führt zu einer geringeren gegenseitigen Abstoßung der Partikel und ab einem pH-Wert von 2,5 ist eine Zunahme der Partikelgröße zu beobachten.

Wie bereits in Kapitel 4.1.4.1 gezeigt werden konnte, weisen insbesondere die Tween® 80- und Poloxamer 188-stabilisierten M500-Emulsionen auch negative Partikelladungen auf. Es wird angenommen, dass diese durch spezifische Ionenadsorption von Hydroxid-Ionen an den Polyoxyethylenketten der Emulgatoren bedingt sind (31,32). Analog wäre es bei den Saccharoseestern denkbar, dass Hydroxid-Ionen an die Etherbrücke zwischen Fruktose und Glukose insbesondere im alkalischen Milieu gebunden werden und folglich das negative Zetapotenzial der S570-M500-Emulsion bedingen. Nimmt der pH-Wert jedoch ab, beispielsweise durch den Zusatz des künstlichen Magensaftes, tritt eine Zunahme an Protonen auf, die die negativen Ladungen ausgleichen und somit zu einem deutlich geringeren negativen Zetapotenzial führen würden. Auch Zimmermann et al. beschrieben eine pH-abhängige Instabilität der von ihnen untersuchten festen Lipidnanopartikel, die mit dem Saccharoseester S1670 hergestellt wurden (270).

Unklar ist jedoch, wieso diese möglichen Ladungen an der Grenzfläche sowie an der Etherbrücke der Saccharose nur bei den Saccharoseester-stabilisierten Emulsionen und nicht auch bei anderen Formulierungen mit nichtionischen Emulgatoren wie beispielsweise Tween® 80 so stark ausgeprägt sind. Die Tween® 80-haltige M500-Emulsion weist bei einem pH-Wert von 6 ein deutlich weniger negatives Zetapotenzial (-21 mV) als die S570-stabilisierte Emulsion (-52 mV) auf (vgl. Abb. 4-12 und Abb. 4-13, *rechts*).

Ergänzend zu den diskutierten Untersuchungen wurden je 1 ml einer S570-Lösung (50 mg/ml) mit 49 ml 0,1 M HCl bzw. mit 49 ml Aqua bidest versetzt. Nach Zusatz der 0,1 M HCl zu der Saccharoseester-Lösung war ein Niederschlag zu beobachten (Abb. 4-14, *rechts*). Bei der Verdünnung mit Wasser dagegen war keine Trübung sichtbar (Abb. 4-14, *links*).

Um zu klären, ob es sich bei dem Niederschlag eventuell um freie Stearinsäure handelt, die durch eine saure Esterhydrolyse des Saccharoseesters S570 entstanden ist, wurde der Niederschlag abzentrifugiert und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie und Raman-Spektroskopie untersucht.



Abb. 4-14: Zusatz von Aqua bidest (*links*) bzw. 0,1 M HCl (*rechts*) zu einer S570-Lösung (50 mg/ml)

Dünnschichtchromatographie (DC)

Im Folgenden wurden die unbehandelte S570-Lösung, der abzentrifugierte Niederschlag der S570-Lösung nach Zusatz von 0,1 M HCl in verschiedenen Konzentrationen sowie Palmitinsäure als Referenzsubstanz dünnschichtchromatographisch untersucht. Palmitinsäure (C16) und Stearinsäure (C18) sind beide gesättigte Fettsäuren, die aufgrund einer ähnlichen Polarität auch einen ähnlichen Retentions-Faktor (R_f -Wert) besitzen (278). Da für die DC keine Stearinsäure vorhanden war, wurde Palmitinsäure als Referenz für die freie Stearinsäure eingesetzt.

Die mit Kupfersulfat-Lösung detektierte DC-Platte (siehe Abb. 4-15) zeigt, dass die Banden des untersuchten Niederschlages der S570-Lösung (2.-7. Probe von links) mit denen der unbehandelten S570-Lösung (1. Probe von links) übereinstimmen. Die Banden der 3. Probe von links sind hinsichtlich der Konzentration des Niederschlages mit denen der S570-Lösung (50 mg/ml) zu vergleichen.

Bei beiden Proben ist keine für Palmitin- bzw. Stearinsäure charakteristische Bande zu erkennen. Mit steigender Konzentration des wieder gelösten Niederschlages ist auf Höhe der Palmitinsäure eine schwache Bande zu erahnen, die Banden des Saccharoseesters S570 sind jedoch weiterhin sehr deutlich zu erkennen.

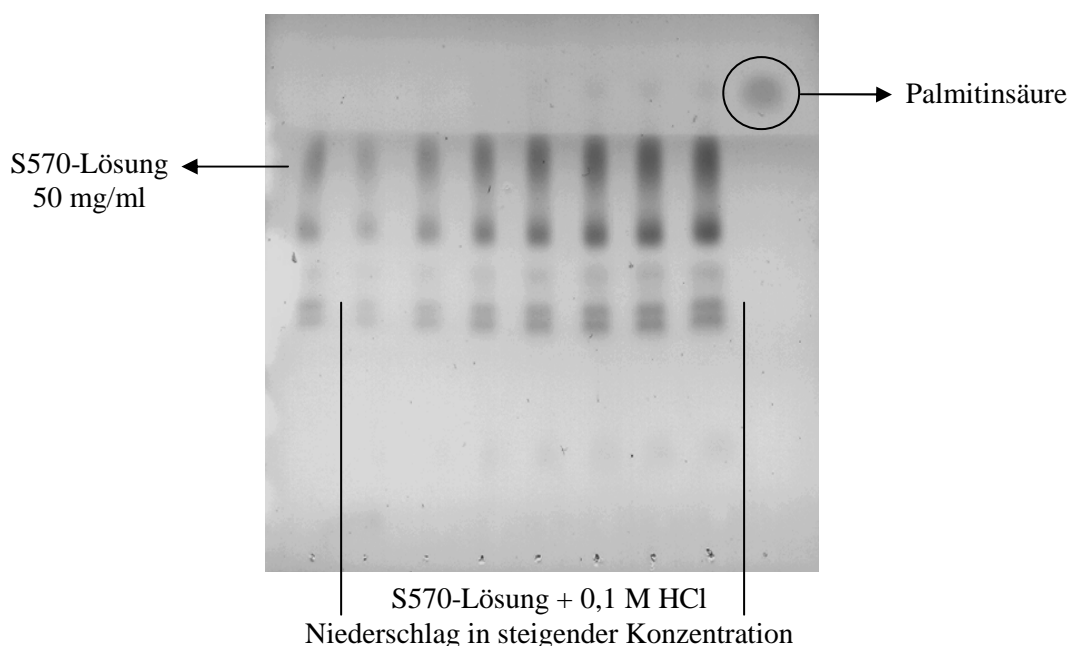


Abb. 4-15: DC-Untersuchung zur Esterhydrolyse des Saccharoseesters S570

Die DC-Untersuchungen weisen auf ein Löslichkeitsproblem der Saccharoseester im stark sauren Milieu hin, da der geprüfte Niederschlag das gleiche Bandenmuster wie die unbehandelte S570-Lösung zeigt. Um jedoch eine eventuell ablaufende Esterhydrolyse endgültig auszuschließen, wurden weitere Untersuchungen mittels Mikro-Raman-Spektroskopie durchgeführt.

Mikro-Raman-Spektroskopie

Der Niederschlag der S570-Lösung nach Zusatz von 0,1 M HCl wie auch das reine S570-Pulver wurden mittels Mikro-Raman-Spektroskopie vermessen. In Abb. 4-16 (*unten*) ist zu erkennen, dass die Spektren der beiden untersuchten Proben (Niederschlag und unbehandeltes S570-Pulver) identisch sind. Somit konnten die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen bestätigt und eine Esterhydrolyse des Saccharoseesters ausgeschlossen werden.

Die Koaleszenz der Siliconöltropfen nach Zusatz des künstlichen Magensaftes zur S570-Emulsion konnte im Mikroskop beobachtet werden (Foto *oben* und *Mitte*). Die großen Tropfen, die sich nach Zusatz des künstlichen Magensaftes auf dem Objektträger gebildet haben, konnten mittels Raman-Spektroskopie eindeutig als Siliconöl identifiziert werden.

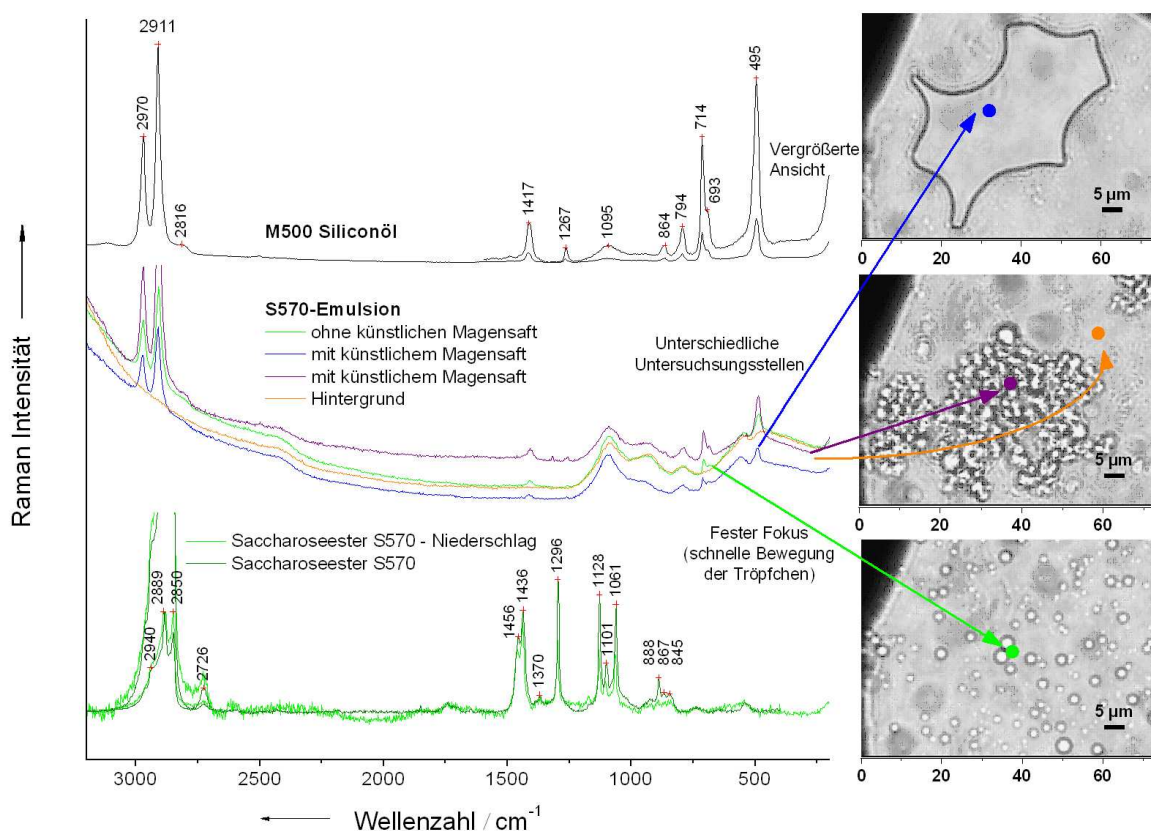


Abb. 4-16: Untersuchungen mittels Raman-Spektroskopie zur Stabilität der S570-M500-Emulsion im künstlichen Magensaft; *oben*: Spektrum des reinen Siliconöls M500; *Mitte*: Vergleich der S570-M500-Emulsion vor und nach Zusatz des künstlichen Magensaftes → Beobachtung der Koaleszenz; *unten*: Vergleich des reinen S570-Pulvers mit dem Niederschlag der S570-Lösung nach Zusatz von 0,1 M HCl

In Tab. 4-5 sind die für Siliconöle charakteristischen Banden zusammengestellt, die auch bei der Untersuchung der koaleszierenden Tropfen dem Siliconöl zugeordnet werden konnten (279,280).

Tab. 4-5: Zuordnung der für Siliconöl charakteristischen Banden (279)

Wellenzahl [cm^{-1}]	Bandenzuordnung
2970 2911	C-H symmetrische Streckschwingung
1417	C-H ₃ asymmetrische Deformationsschwingung
714	C-Si-C symmetrische Streckschwingung
495	O-Si-O symmetrische Streckschwingung

Zusammenfassung

In den Untersuchungen zur Stabilität der M500-Siliconölemulsionen nach Zusatz von künstlichem Magensaft konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme der Saccharoseester-stabilisierten Emulsionen alle Zubereitungen stabil waren. Als Ursache für die Instabilität der S570-Emulsion wurde der stark saure pH-Wert identifiziert, der zu einer Verminderung der Löslichkeit des Saccharoseesters führt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass das Zetapotenzial der S570-stabilisierten Siliconölemulsion im stark sauren Milieu weniger negativ ist. Das Ausfallen des Emulgators und die veränderte Ladung der Siliconöltröpfchen im sauren Milieu sind die möglichen Ursachen für die Koaleszenz der Siliconöltröpfchen, die mittels Mikro-Raman-Spektroskopie gut beobachtet werden konnte (siehe Abb. 4-16).

4.1.5 Kommerzielle Siliconölemulsionen

Da Siliconöle aufgrund ihrer hohen Oberflächenaktivität in der Medizin bereits als Antiflatulenz und Karminativum eingesetzt werden, sind verschiedene pharmazeutisch zugelassene O/W-Siliconölemulsionen kommerziell erhältlich. Im Folgenden werden fünf ausgewählte Präparate hinsichtlich ihrer Partikelgröße und Magensaftstabilität untersucht, um die Qualität der in Kapitel 4.1.2 - 4.1.4 diskutierten selbst hergestellten Siliconölemulsionen besser einordnen zu können.

4.1.5.1 Zusammensetzung und Partikelgröße kommerzieller Siliconölemulsionen

Zunächst wurden die Partikelgrößen der kommerziellen Siliconölemulsionen mittels Laserdiffraktometrie bestimmt und mit den Teilchengrößen von drei selbst hergestellten Emulsionen verglichen (Tab. 4-6). Zur Formulierung der eigenen Emulsionen wurden drei verschieden viskose Siliconöle (35 %) sowie das Emulgatorgemisch HLB 8,5 (2 %) eingesetzt. Beim Vergleich der Partikelgrößen der untersuchten kommerziellen und selbst hergestellten Siliconölemulsionen ist zu erkennen, dass die im Handel erhältlichen Zubereitungen deutlich größere Partikel aufweisen (Tab. 4-6).

Tab. 4-6: Vergleich der Partikelgrößenparameter (Mean, D50- und D99-Werte) der kommerziellen Siliconölemulsionen mit denen von drei selbst hergestellten Siliconölemulsionen (M10, M500 und M1000); Zusammensetzung der kommerziellen Emulsionen siehe Anhang A2, Tab. A2-1

		Mean [μm]	D50 [μm]	D99 [μm]
M10	<div> <div>Siliconöl 35 %</div> <div>Emulgator (HLB 8,5) 2 %</div> <div>Wasser ad 100 %</div> </div>	0,35	0,36	0,55
M500		2,01	2,27	5,48
M1000		3,50	3,62	7,96
Elugan [®] Tropfen		10,50	16,94	147,10
Espumisan [®] Emulsion		4,97	6,66	21,12
Lefax [®] Pump-Liquid		6,96	11,38	33,72
Sab Simplex [®]		5,34	6,91	33,85
Silfar [®] SE 4		13,91	12,55	165,70

Die Viskosität des verwendeten Siliconöls war mit Ausnahme der Sab Simplex[®]-Emulsion ($350 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) bei keiner der untersuchten kommerziellen Produkte angegeben. Nach der Definition des Arzneibuchs sind Dimeticone Polydimethylsiloxane mit einem Polymerisationsgrad von $n=20$ bis $n=400$, sodass ihre kinematische Viskosität von 20 bis $1300 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ reicht (53). Aus diesem Grund wurden die kommerziellen Emulsionen mit einer selbst hergestellten M10-, M500- sowie einer M1000-Siliconölemulsion verglichen, um den möglichen Viskositätsbereich der eingesetzten Siliconöle in den kommerziellen Produkten weitgehend abzudecken.

Außer Silfar[®] SE 4 (ca. 29 % Siliconöl) weisen alle kommerziellen Siliconölemulsionen einen deutlich geringeren Siliconölgehalt (ca. 4-7 %) als die selbst hergestellten Emulsionen (35 %) auf. Die im Handel erhältlichen Produkte werden außerdem alle mit Simecon hergestellt, da Simecon im Vergleich zu Dimeticon eine deutlich höhere Aktivität als Entschäumer besitzt (3). Die Zusammensetzung der kommerziellen Emulsionen (siehe Anhang A2, Tab. A2-1) ist weiterhin deutlich komplexer als die der selbst hergestellten Siliconölemulsionen. Die kommerziellen Zubereitungen enthalten verschiedene Stabilisatoren (nichtionogene Emulgatoren, Viskositätserhöher, Feststoffpartikel), Konservierungsmittel, Geschmackskorrigenzien sowie weitere Bestandteile.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die selbst formulierten Siliconölemulsionen trotz eines höheren Siliconölgehaltes deutlich geringere Teilchengrößen aufweisen und weniger komplex zusammengesetzt sind. Dies ist insbesondere für die geplanten mikrobiologischen und in-vivo-Studien von Bedeutung, da so der Einfluss der einzelnen Komponenten der Formulierung besser differenziert werden kann.

4.1.5.2 Stabilität der kommerziellen Emulsionen im künstlichen Magensaft

Auch die kommerziellen Siliconölemulsionen wurden hinsichtlich ihrer Stabilität im künstlichen Magensaft (ohne Pepsin) untersucht. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 4.1.4 (Stabilität der M500-Emulsionen) beschrieben. In Abb. 4-17 ist der Einfluss des künstlichen Magensaftes auf den Median-Wert der kommerziellen Siliconölemulsionen dargestellt.

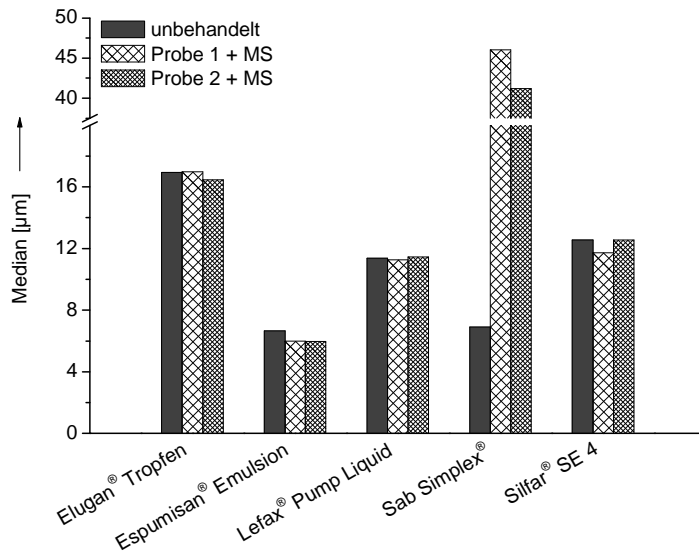


Abb. 4-17: Vergleich der Median-Werte der kommerziellen Siliconölemulsionen 2 h nach Zusatz des künstlichen Magensaftes (MS) mit denen der unbehandelten Probe (Probe 1 und 2 sind Parallelmessungen)

Nur die Sab Simplex®-Proben zeigten 2 h nach Zusatz des künstlichen Magensaftes eine deutliche Zunahme des Median-Wertes. Alle anderen untersuchten kommerziellen Produkte waren stabil. Sab Simplex® ist mit einem nichtionogenen Emulgator (α -Octadecyl- ω -hydroxypoly(oxyethylen)₅) sowie den Polymeren Hypromellose und Carbomer 974 stabilisiert (siehe Anhang A2, Tab. A2-1). Carbomere sind Polyacrylsäuren hohen Molekulargewichts, die gering mit Polyalkenethern von Zuckern und Polyalkoholen quervernetzt sind. Im sauren Milieu ist das Carbomer 974 unlöslich und fällt aus. Die Zunahme des Medians der Sab Simplex®-Probe nach Zusatz des künstlichen Magensaftes könnte somit sowohl durch die Koaleszenz der Partikel als auch durch ausgefallene Carbomer 974-Partikel bedingt sein. Um die Ursache für die Instabilität von Sab Simplex® im stark sauren Milieu zu klären, wurde je eine Probe mit Wasser bzw. 0,1 M HCl versetzt und anschließend mikroskopisch untersucht (Abb. 4-18).

Nach Zusatz der 0,1 M HCl konnten in der Probe Bereiche mit unveränderten Tröpfchen beobachtet werden (Bild III), die den mikroskopischen Ausschnitten, die nach der Verdünnung mit Wasser aufgenommen wurden (Bild I+II), gleichen. An manchen Stellen waren jedoch auch Agglomerate sichtbar (Bild IV), bei denen die Partikel in ihrer Form und Größe trotzdem z.T. noch gut zu erkennen waren. Es ist somit denkbar, dass die Zunahme des Median-Wertes von Sab Simplex® nach Zusatz des künstlichen Magensaftes durch das Ausfallen von Carbomer-Partikeln bedingt ist.

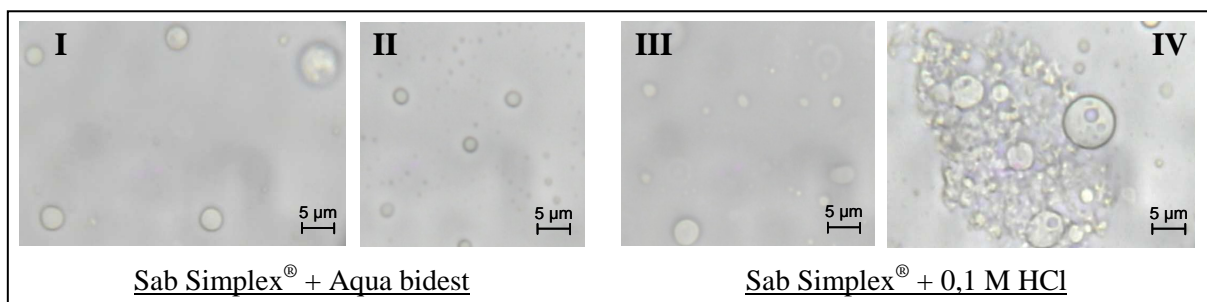


Abb. 4-18: Mikroskopische Untersuchung von Sab Simplex® nach Zusatz von Aqua bidest (links; Bild I+II) bzw. von 0,1 M HCl (rechts; Bild III+IV)

4.2 Einfluss der Viskosität der äußeren Phase auf die Partikelgröße von Siliconölemulsionen und Nanopartikeln

Bei der Herstellung der Emulsionen mit verschiedenen viskosen Siliconölen konnte beobachtet werden, dass eine Zunahme der Viskosität der inneren Phase zu einer Zunahme der Partikelgröße der Emulsionen führt, auch wenn die Emulsionen unter gleichen Bedingungen formuliert wurden (siehe Kapitel 4.1.2.1). Das Ziel war es nun, Emulsionen mit verschiedenen viskosen Siliconölen herzustellen, die jedoch eine ähnliche Partikelgröße aufweisen. Dies ist von Bedeutung, um bei weiteren Untersuchungen (auch an biologischen Systemen) beim Vergleich der verschiedenen Siliconölemulsionen Partikelgrößeneffekte von Viskositätseffekten trennen zu können.

Eine Beeinflussung der Partikelgröße von Emulsionen kann einerseits durch die Variation der Herstellungsbedingungen erfolgen. Eine Erhöhung der Homogenisationstemperatur ist jedoch, wie bereits erwähnt, wenig sinnvoll, da Siliconöle nur eine sehr geringe Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur besitzen (1,45). Auch eine Steigerung des Homogenisationsdruckes erwies sich bei niedriger viskosen Siliconölen (z.B. M100) als ungeeignet (siehe Kapitel 4.1.1.1).

Andererseits könnte man durch die Erhöhung der Emulgatorkonzentration die Partikelgröße beeinflussen. Dies führte zwar in den bereits beschriebenen Untersuchungen zu einer Abnahme der Partikelgrößen der Emulsionen (siehe Kapitel 4.1.2.4), die Emulgatorkonzentration sollte aber in den verschiedenen Siliconölemulsionen gleich sein.

Ein weiterer in der Literatur beschriebener Parameter, der sich auf die Partikelgröße der Emulsionen auswirken könnte, ist die Viskosität der äußeren Phase (281-283). Im Folgenden wurde durch die Erhöhung der Viskosität der wässrigen Phase versucht, Emulsionen mit unterschiedlich viskosen Siliconölen, aber mit ähnlicher Partikelgröße unter Standardherstellungsbedingungen zu formulieren.

4.2.1 Siliconölemulsionen

Zur Erhöhung der Viskosität der äußeren Phase wurden einerseits drei Polyethylenglykol-Typen (PEG) mit unterschiedlichem Molekulargewicht (PEG 400, PEG 1000, PEG 4000) ausgewählt. Das PEG 400 wurde in 6 verschiedenen Konzentrationen (10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %), das PEG 1000 und das PEG 4000 nur in einer Konzentration von 10 % eingesetzt. Andererseits wurden 25%- und 50%ige Saccharose-Lösungen als wässrige Phasen zur Herstellung der Emulsionen verwendet. Die Siliconölemulsionen hatten einen Ölanteil von 35 % und wurden mit 2 % Tween® 80 stabilisiert. Zunächst wurden die Viskositäten der reinen PEG 400-Lösungen bei 20°C und 25°C bzw. nach Zusatz von 2 % Tween® 80 zu den Lösungen (nur bei 25°C) bestimmt (Abb. 4-19). Alle 3 Messreihen wiesen eine exponentielle Zunahme der dynamischen Viskosität mit steigender PEG 400-Konzentration auf. Bei einer Temperatur von 25°C wurden, wie erwartet, geringere Viskositäten der reinen PEG 400-Lösungen ermittelt. Die Mischung von Wasser und PEG 400 führte jedoch selbst in einem Verhältnis 1:1 (50 % PEG 400) nur zu einer relativ geringen der dynamischen Viskosität ($\eta=12,8 \text{ mPa}\cdot\text{s}$).

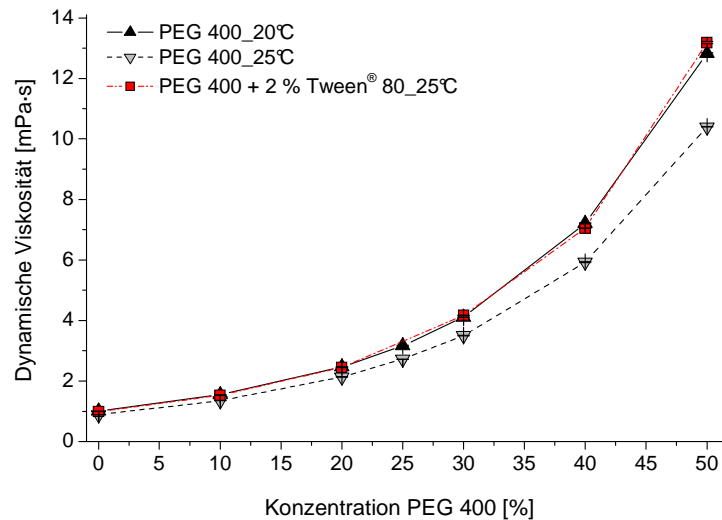


Abb. 4-19: Darstellung der dynamischen Viskosität der PEG 400-Lösungen in Abhängigkeit von der PEG 400-Konzentration (Bestimmung bei 20°C und 25°C) sowie nach Zusatz von 2 % Tween® 80 zu den Lösungen (Bestimmung bei 25 °C)

Außerdem konnte beobachtet werden, dass für die PEG 400-Lösungen mit Emulgatorzusatz bei 25°C ähnliche Werte der dynamischen Viskosität wie für die PEG 400-Lösungen ohne Tween® 80 bei 20°C bestimmt wurden. Demzufolge bewirkt der Zusatz des Emulgators Tween® 80 eine weitere geringe Zunahme der Viskosität der Lösungen.

Gegenstand der folgenden Untersuchungen war der Einfluss der Viskosität der äußeren Phase auf die Partikelgröße einer 35%igen M100-Siliconölemulsion. Die Viskosität der äußeren Phase der Emulsionen wurde zunächst durch den Zusatz von PEG 400 variiert. In Abb. 4-20 (*links*) kann man deutlich erkennen, dass mit zunehmender Viskosität der wässrigen Phase (zunehmender PEG 400-Gehalt) die Partikelgrößen der M100-Emulsionen abnehmen. Mit steigender PEG 400-Konzentration in der äußeren Phase (10 % und 20 % PEG 400) tritt zunächst eine starke Reduktion der D50- und D99-Werte der Emulsionen auf. Wird jedoch der PEG 400-Anteil der wässrigen Phase und somit deren Viskosität weiter erhöht (dynamische Viskosität der äußeren Phase > 2 mPa·s; > 20 % PEG 400), ist nur noch eine geringe bzw. keine weitere Abnahme der Partikelgrößen festzustellen. Auch die Teilchengrößenkurven der untersuchten Emulsionen spiegeln diese Beobachtungen gut wider (Abb. 4-20, *rechts*). Die Teilchengrößenverteilungen der Emulsionen mit Wasser bzw. mit 10 % PEG 400 als äußere Phase unterscheiden sich deutlich. Bei allen weiteren PEG-haltigen Siliconölemulsionen sind die Veränderungen in den Teilchengrößenverteilungen nur noch gering.

Interessant war außerdem das optische Erscheinungsbild der M100-Emulsionen, die in Abb. 4-21 dargestellt sind. Im Gegensatz zu allen weiteren Emulsionen, die ein milchiges Aussehen hatten, war die Siliconölemulsion mit 50 % PEG 400 in der wässrigen Phase transparent. Diese Beobachtung lässt sich mit Hilfe der Brechungsindizes erklären. Diese sind offensichtlich bei der Emulsion mit 50 % PEG 400 für die äußere und innere Phase der Emulsion gleich und führen somit zur Transparenz der Emulsion (Immersion).

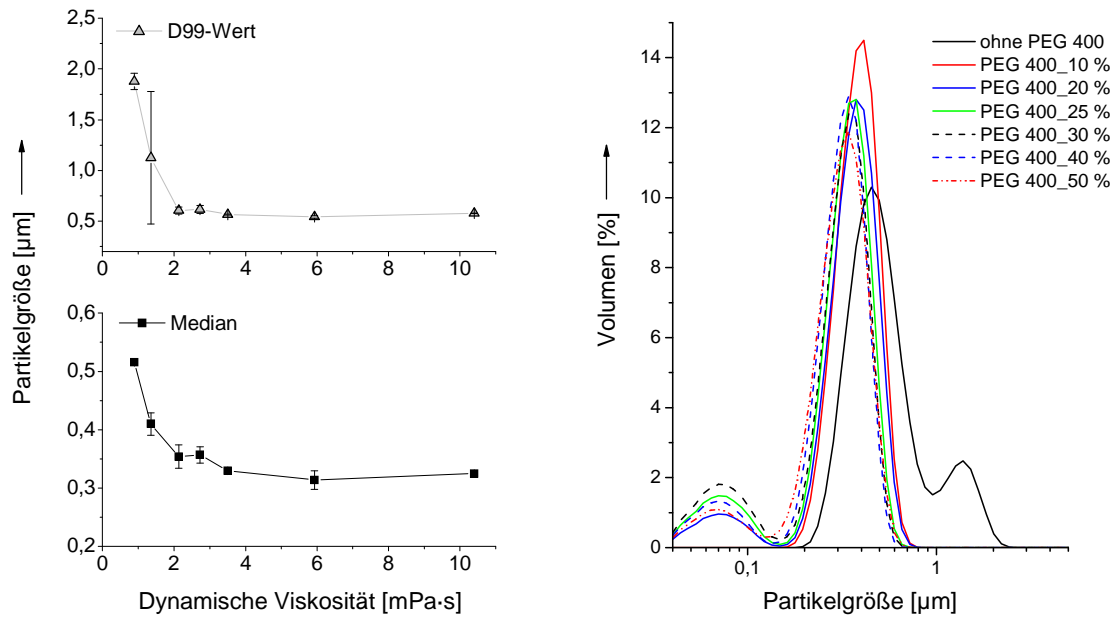


Abb. 4-20: Einfluss des Zusatzes von PEG 400 zur äußeren Phase auf die Partikelgrößen der Emulsionen (Zusammensetzung: 35 % M100, 2 % Tween® 80, wässrige Phase ad 100 %); *links:* Abnahme der Partikelgrößenwerte D50 (Median) und D99 in Abhängigkeit von der dynamischen Viskosität der äußeren Phase (Werte der dynamischen Viskosität entsprechen 0 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % bzw. 50 % PEG 400); *rechts:* Darstellung der volumenbezogenen Teilchengrößenverteilungen der Emulsionen mit unterschiedlichen PEG 400-Anteilen in den äußeren Phasen; Bestimmung mittels Laserdiffraktometrie

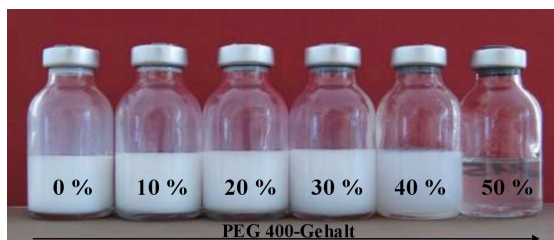


Abb. 4-21: Makroskopisches Erscheinungsbild der M100-Siliconölemulsionen mit PEG 400 als Viskositätserhöher in der äußeren Phase; Zunahme des PEG 400-Gehaltes in der äußeren Phase der Emulsionen von links nach rechts (Zusammensetzung der Emulsionen: 35 % M100, 2 % Tween® 80, wässrige Phase ad 100 %)

Zur Erhöhung der Viskosität der äußeren Phase der Emulsionen wurde jedoch nicht nur PEG 400, sondern auch PEG 1000 und PEG 4000 als 10%ige Lösungen eingesetzt. Die verschiedenen Polyethylenglykole zeigten trotz ähnlicher Viskosität der wässrigen Phasen einen unterschiedlich starken Einfluss auf die Partikelgröße der Emulsionen (siehe Abb. 4-22). Dies wird beispielsweise beim Vergleich der Median-Werte der Emulsionen, die mit 25 % PEG 400 ($\eta=2,73$ mPa·s) bzw. 10 % PEG 4000 ($\eta=2,93$ mPa·s) in der äußeren Phase formuliert wurden, deutlich. Die mit PEG 4000 hergestellte Emulsion wies etwas kleinere Partikelgrößen auf, obwohl die Viskosität der äußeren Phase nur geringfügig größer ist als bei der Emulsion mit 25 % PEG 400. Auch die Emulsionen mit einem höheren Anteil von PEG 400 (> 25 %) weisen trotz einer höheren Viskosität der äußeren Phase (z.B. 50 % PEG 400: $\eta=10,4$ mPa·s) etwas größere Partikel als die Emulsion mit 10 % PEG 4000 auf. Die Darstellung in Abb. 4-22 erlaubt die Vermutung, dass auch der Einsatz von PEG 1000 eine effizientere Reduktion der Partikelgröße der Emulsionen im Vergleich zum niedermolekularen PEG 400 bewirkt. Demzufolge führen höhermolekulare Polyethylenglykole möglicherweise zu einer effektiveren Partikelgrößenreduktion. Um diese Annahme zu bekräftigen und sicherzustellen, dass die

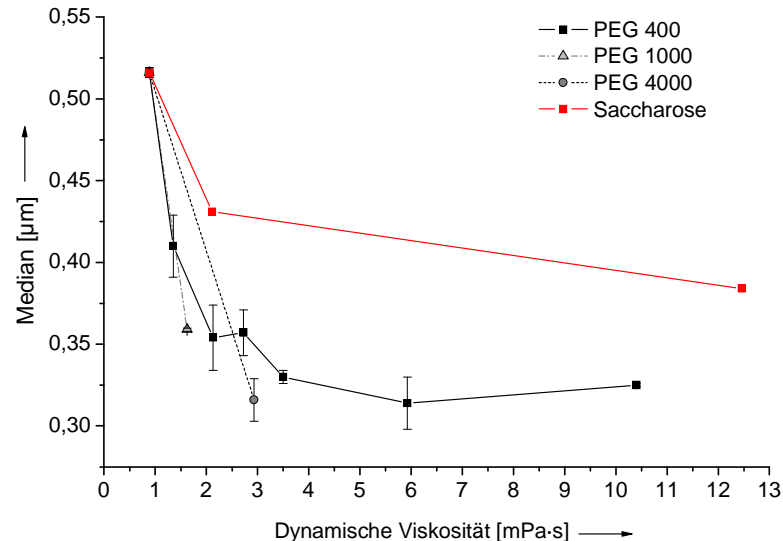


Abb. 4-22: Vergleich des Einflusses verschiedener Viskositätserhöher (Zusatz zur äußeren Phase) auf die Partikelgröße (LD-PIDS-Messungen) der Emulsionen (Zusammensetzung: 35 % M100, 2 % Tween[®] 80, wässrige Phase ad 100 %); Darstellung der Abnahme des Medians der Teilchengrößenverteilungen in Abhängigkeit von der dynamischen Viskosität der äußeren Phase

die beobachteten Effekte nicht nur durch experimentelle Streuung bedingt sind, wären weitere Untersuchungen erforderlich.

Die M100-Siliconölemulsionen wurden weiterhin mit 25 % bzw. 50 % Saccharose in der äußeren Phase hergestellt. Diese Emulsionen sind jedoch deutlich grobdispenser als die PEG-Emulsionen mit ähnlich viskosen äußeren Phasen (siehe Abb. 4-22).

Die vorgestellten Ergebnisse bestätigen somit die Angaben der Literatur (281,284), dass eine Erhöhung der Viskosität der äußeren Phase die Partikelgrößen der Emulsionen verringert. Dies kann unter anderem auf eine verminderte Koaleszenzwahrscheinlichkeit der Partikel zurückgeführt werden, unter der Annahme, dass die Beweglichkeit der Öltröpfchen durch die erhöhte Viskosität der äußeren Phase stärker eingeschränkt ist als die des niedermolekularen Emulgators Tween[®] 80 (283). Folglich kann die bei der Homogenisation neu gebildete Grenzfläche ausreichend schnell stabilisiert werden und die Koaleszenz der Tröpfchen wird vermindert. Weiterhin wirken durch die erhöhte Viskosität der äußeren Phase größere Scherkräfte auf die Tröpfchen der inneren Phase, wodurch ein erleichtertes Aufbrechen und eine feinere Emulgierung erzielt werden kann (282).

Interessanterweise beeinflussen die verschiedenen Viskositätserhöher trotz einer ähnlichen Viskosität der äußeren Phase die Partikelgröße der Emulsion unterschiedlich stark. Es ist denkbar, dass die Polyethylenglykole aufgrund ihrer Eigenschaften nicht nur als Viskositätserhöher, sondern ebenso als Lösungsvermittler fungieren und somit zusätzlich die Verfügbarkeit des Emulgators Tween[®] 80 verbessern. Der Effekt der Partikelgrößenreduktion ist mit Sicherheit aber auch auf die Erhöhung der Viskosität der äußeren Phase zurückzuführen, da auch die Emulsionen mit Saccharose in der wässrigen Phase eine Abnahme der Partikelgrößen zeigten.

Das Hauptziel dieser Studie war es jedoch, Emulsionen mit verschiedenen viskosen Siliconölen, aber ähnlicher Partikelgröße durch die Veränderung der Viskosität der äußeren Phase unter gleichen Herstellungsbedingungen zu erhalten. Als Viskositätserhöher wurde PEG 400 eingesetzt. Zunächst sollte die Formulierung von M10- und M100-Siliconölemulsionen mit annähernd gleicher Partikelgröße unter Standardherstellungsbedingungen erfolgen. Um dies zu realisieren, wurden die bereits gewonnenen Ergebnisse zum Einfluss des Zusatzes von unterschiedlichen PEG 400-Konzentrationen zur äußeren Phase der M100-Emulsionen auf deren Partikelgröße berücksichtigt (siehe oben; Abb. 4-20). Dabei wurde festgestellt, dass die M100-Emulsion mit 40 % PEG 400 in der wässrigen Phase eine ähnliche Teilchengrößenverteilung wie die M10-Siliconölemulsion (ohne Viskositätserhöher) aufwies (siehe Abb. 4-23, *links*). In der M100-Emulsion ohne PEG 400 waren dagegen deutlich größere Partikel nachweisbar.

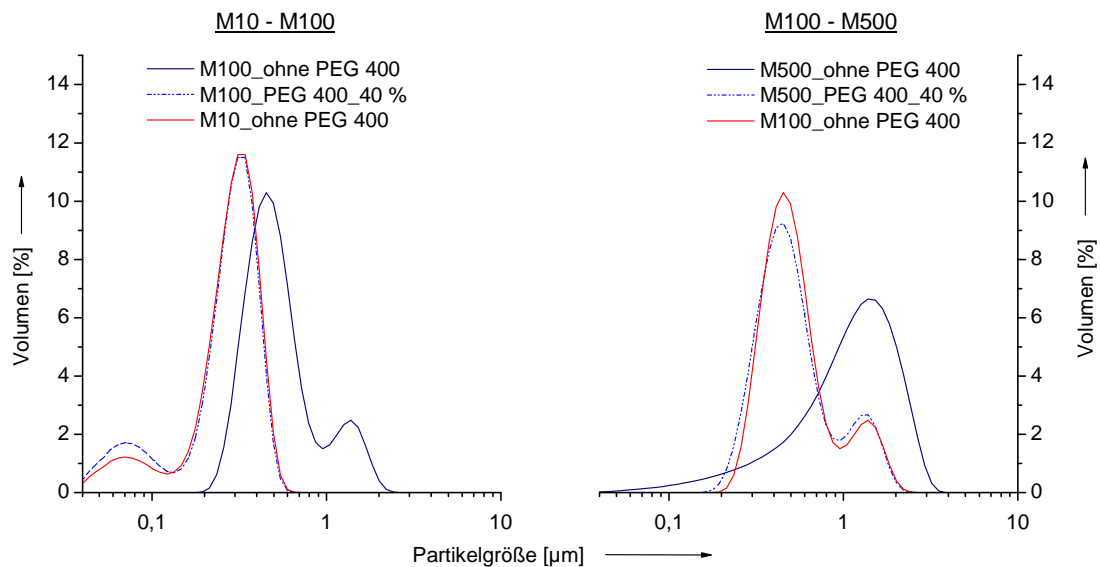


Abb. 4-23: Angleichen der Partikelgrößen von Siliconölemulsionen mit unterschiedlich viskosen Siliconölen durch den Zusatz von PEG 400 zur äußeren Phase; *links*: Vergleich einer M10- und M100-Siliconölemulsion (mit und ohne Zusatz von 40 % PEG 400 zur äußeren Phase); *rechts*: Vergleich einer M100- und M500-Siliconölemulsion (mit und ohne Zusatz von 40 % PEG 400 zur äußeren Phase); (Zusammensetzung der Emulsionen: 35 % Siliconöl, 2 % Tween® 80, wässrige Phase ad 100 %); LD-PIDS-Messungen

In einem zweiten Versuch sollten die Partikelgrößen einer M500- und einer M100-Siliconölemulsion angeglichen werden. Die M500-Siliconölemulsion wurde mit 40 % PEG 400 in der äußeren Phase formuliert, da sich im ersten Versuch (M10- und M100-Siliconölemulsionen) der Zusatz von 40 % PEG 400 zur äußeren Phase der M100-Emulsion als geeignet erwies, um eine entsprechende Partikelgrößenreduktion zu erzielen. Auch hier trat bei der M500-Siliconölemulsion mit 40 % PEG 400 in der äußeren Phase eine ähnliche Teilchengrößenverteilung wie bei der M100-Emulsion ohne Zusatz eines Viskositätserhöhers auf (Abb. 4-23, *rechts*).

Die Ergebnisse zeigen somit deutlich, dass durch die Veränderung der Viskosität der äußeren Phase die Partikelgrößen der Emulsionen mit verschiedenen viskosen Siliconölen auf ähnliche Werte eingestellt werden können (gleiche Herstellungsbedingungen). Von großem Vorteil ist dabei, dass die

Polyethylenglykole, die als Viskositätserhöher eingesetzt wurden, beispielsweise durch Ultrafiltration oder Dialyse entfernt werden könnten (285). Nach einer solchen Behandlung würden die Emulsionen mit unterschiedlich viskosen Siliconölen nicht nur gleiche Partikelgrößen, sondern auch die gleiche Zusammensetzung aufweisen. Würde man dagegen versuchen, die Partikelgrößen der Siliconölemulsionen durch die Variation der Emulgatorkonzentration zu beeinflussen, wäre die Entfernung von überschüssigem Emulgator, wie z.B. dem niedermolekularem Tween[®] 80, aus der äußeren Phase schwieriger zu realisieren.

4.2.2 Nanopartikel

In einer ergänzenden Untersuchung wurde versucht, den Effekt der Teilchengrößenreduktion durch die Erhöhung der Viskosität der äußeren Phase auf Lipidnanopartikel zu übertragen. Dazu wurde die in Tab. 4-7 dargestellte Rezeptur ausgewählt. Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte in 2 Ansätzen (wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben) mit und ohne Zusatz von 40 % PEG 400 zur äußeren Phase.

Tab. 4-7: Zusammensetzung der Lipidnanopartikel

Substanz	Konzentration (m/m)
Tyloxapol	6 %
Dynasan 114	10 %
2,25 % Glycerol in Wasser bzw. mit Zusatz von 40 % PEG 400	ad 100 %

In Abb. 4-24 sind die Teilchengrößenverteilungen der Nanopartikelrezepturen, mit und ohne PEG 400 in der äußeren Phase, dargestellt. Diese Bestimmung erfolgte mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS).

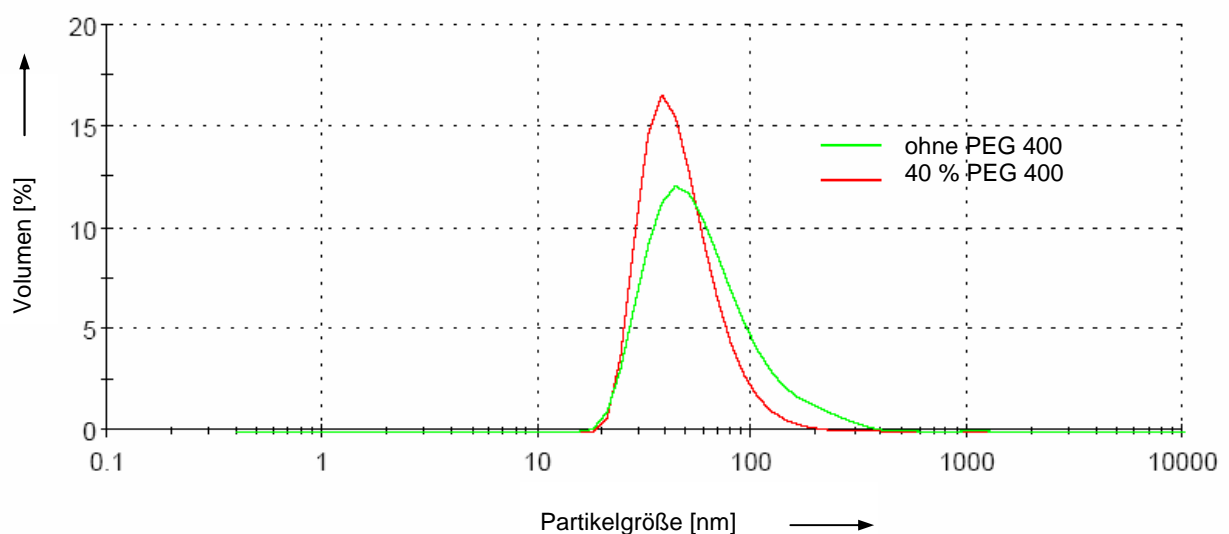


Abb. 4-24: Einfluss des Zusatzes von 40 % PEG 400 zur äußeren Phase auf die Partikelgröße einer Lipidnanopartikelformulierung; Darstellung der Teilchengrößenverteilungen der Nanopartikel ohne und mit PEG 400 in der äußeren Phase; Bestimmung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Es ist deutlich sichtbar, dass sich die beiden Nanopartikelformulierungen hinsichtlich ihrer Partikelgröße und auch in der Breite der volumenbezogenen Teilchengrößenverteilungen unterscheiden. Der Z-Average (mittlerer Durchmesser, siehe auch Kapitel 3.3.1.3) sowie der Polydispersitätsindex der Nanopartikel mit 40 % PEG 400 in der äußeren Phase sind geringer als bei den Nanopartikeln ohne Zusatz eines Viskositätserhöher (siehe Tab. 4-8).

Tab. 4-8: Vergleich von Z-Average und Polydispersitätsindex (PI) der beiden Lipidnanopartikelformulierungen mit und ohne PEG 400 in der äußeren Phase (Bestimmung mittels PCS)

	Lipidnanopartikel	
	ohne PEG 400	40 % PEG 400
Z-Average [nm]	90,92 ± 0,37	65,49 ± 0,08
PI	0,200 ± 0,002	0,179 ± 0,001

Somit konnte gezeigt werden, dass die Partikelgröße der ausgewählten Lipidnanopartikelrezeptur durch den Zusatz von 40 % PEG 400 zur äußeren Phase reduziert werden kann.

4.2.3 Zusammenfassung

Abschließend kann festgestellt werden, dass es möglich ist, durch die Erhöhung der Viskosität der äußeren Phase eine Reduktion der Partikelgröße von Emulsionen sowie auch von Lipidnanopartikeln zu erzielen. Folglich konnte gezeigt werden, dass man durch die Variation der Viskosität der äußeren Phase Emulsionen mit unterschiedlich viskosen Siliconölen aber ähnlicher Partikelgrößen unter Standardherstellungsbedingungen formulieren kann. Interessanterweise nimmt jedoch nicht nur die Viskosität der äußeren Phase, sondern auch der Typ des eingesetzten Viskositätserhöher Einfluss auf die Partikelgrößen der Siliconölemulsionen (vgl. PEG und Saccharose).

4.3 Untersuchungen zum Ausbreitungsverhalten ausgewählter Siliconölemulsionen

Für die angestrebte Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und möglichen bakteriellen Infektionen des Gastrointestinaltraktes sind die Spreitungseigenschaften der hergestellten Siliconölemulsionen auf Zelloberflächen von großer Bedeutung. Je besser die Filmbildungseigenschaften der Zubereitung sind, umso effektiver sollte die eventuelle erhoffte Stärkung der intestinalen Darmbarriere sein. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung der Ausbreitung verschiedener Siliconölemulsionen. Dazu wurden von ausgewählten Emulsionen die Oberflächenspannung unter Anwendung der Wilhelmy-Methode sowie der Kontaktwinkel auf zwei unterschiedlichen hydrophoben Oberflächen bestimmt (230,231). Die Messung der Kontaktwinkel erfolgte auf hydrophoben Objektträgern, da bei hydrophilen Oberflächen aufgrund der äußeren, wässrigen Phase der Emulsion eine nahezu vollständige Benetzung zu beobachten war. Somit wäre es nicht möglich gewesen, verschiedene Zubereitungen hinsichtlich ihres Ausbreitungsverhaltens zu differenzieren. Um eine zellähnliche Oberfläche zu simulieren, wurden ausgewählte Proben auf lipidierten Objektträgern untersucht, die jedoch vergleichbare Oberflächeneigenschaften wie die mit Nanosol beschichteten Objektträger aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Studien zur Bestimmung der Oberflächenspannung bzw. des Benetzungsverhaltens, die unter Variation verschiedener Parameter durchgeführt wurden, sind in diesem Kapitel zusammengefasst.

Die standardmäßige Rezeptur der charakterisierten Emulsionen ist in Tab. 4-9 dargestellt. Wurden Emulsionen mit abweichender Zusammensetzung untersucht, wird dies im entsprechenden Abschnitt erwähnt. Die Emulsionen wurden unter Anwendung der Standardprozessparameter (siehe Kapitel 4.1.1.3) hergestellt und hinsichtlich ihrer Partikelgröße mittels Laserdiffraktometrie charakterisiert (Median und D99-Wert der Proben siehe Anhang A3, Abb. A3-1).

Tab. 4-9: Zusammensetzung der charakterisierten Emulsionen

Substanz	Konzentration (m/m)
Emulgator (Ausnahme: HPMC 0,5 %)	2 %
Ölkomponente	35 %
Wasser	ad 100 %

4.3.1 Emulgatoreinfluss

Zunächst wurde der Einfluss des Emulgators auf das Ausbreitungsverhalten der Emulsionen untersucht. Dazu wurden von vier verschiedenen M500-Siliconölemulsionen, die jeweils mit einem anderen Emulgator (Cremophor® EL, Poloxamer 188, HPMC 90SH-100, Zuckerester S570) stabilisiert wurden, die Oberflächenspannungen und die Kontaktwinkel bestimmt. Um den Einfluss des Emulga-

tors einschätzen zu können, wurden auch die Oberflächenspannungen der reinen Emulgatorlösungen (Emulgator gelöst in Wasser) ermittelt (Ausnahme: Zuckerester S570).

In Abb. 4-25 (*links*) ist zu erkennen, dass die Cremophor® EL-stabilisierte M500-Siliconölemulsion die geringste Oberflächenspannung aufweist. Vergleicht man die Messwerte der Emulsion mit denen der reinen Cremophor® EL-Lösung (2 % (m/m)), so besitzt die Emulgatorlösung eine höhere Oberflächenspannung.

Die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) für Cremophor® EL wird in der Literatur zwischen 0,009 % (m/v) und 0,013 % angegeben und ist somit in einer 2%igen Lösung des Emulgators deutlich überschritten (286,287). Die geringere Oberflächenspannung der Emulsion im Vergleich zur Emulgatorlösung kann somit vermutlich auf die Oberflächenaktivität des dispergierten Siliconöls zurückgeführt werden.

Auch bei den HPMC-Proben ist dieser Effekt zu beobachten. In der Literatur ist eine kritische Aggregationskonzentration (CAC) für HPMC-Derivate in wässriger Lösung an einer Grenzfläche zu Miglyol® 812 von $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (ca. 0,001 %) HPMC bestimmt worden (34). Man kann annehmen, dass auch in den hier vorgestellten Untersuchungen die CAC von HPMC nicht unterschritten wurde, auch wenn die Ölkomponente Siliconöl statt Miglyol® 812 war.

Im Gegensatz dazu zeigt die Poloxamer 188-Lösung (2 % (m/m)) eine geringere Oberflächenspannung als die entsprechende Emulsion. Das Blockcopolymer Poloxamer 188 besitzt eine vergleichsweise hohe CMC (251,288), die bei einer Konzentration von 2 % (m/m) noch nicht erreicht wird. Bei der Emulsionsherstellung wird freies Poloxamer 188 zur Stabilisierung der neu gebildeten Grenzfläche (Öl/Wasser) benötigt. Dies führt zu einer Abnahme der Poloxamer 188-Konzentration in der wässrigen Phase und somit zu einer Zunahme der Oberflächenspannung. Trotz der Anwesenheit des emulgierten Siliconöls in der Emulsion, das vermutlich die Oberflächenspannung der Formulierung reduziert, ist diese in der reinen Emulgatorlösung geringer als in der Emulsion.

Ergänzend zu den Messungen der Oberflächenspannungen wurden auch die Kontaktwinkel der ausgewählten 35%igen Siliconölemulsionen auf mit anorganischem Nanosol beschichteten Objektträgern verglichen (siehe Abb. 4-25, *rechts*). Die Kontaktwinkel der Emulsionen entsprechen den Ausbreitungseigenschaften auf einer hydrophoben Oberfläche, die bereits über die Oberflächenspannungsmessungen charakterisiert wurden. Die Cremophor® EL-stabilisierten Emulsionen weisen die niedrigsten Werte für die Oberflächenspannung und den Kontaktwinkel auf und spreiten daher am besten auf hydrophoben Oberflächen. Die Poloxamer 188-, HPMC- und S570-stabilisierten Proben unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Kontaktwinkeln und Oberflächenspannungen und lassen folglich ein vergleichbares Spreitungsverhalten auf hydrophoben Oberflächen erwarten.

Außerdem wurden die Kontaktwinkel der Cremophor® EL- und Poloxamer 188-stabilisierten Emulsionen jeweils mit denen der reinen Emulgatorlösungen (2 %) verglichen. Für die Poloxamer 188-stabilisierte Emulsion (Kontaktwinkel $91,7 \pm 0,5^\circ$) konnte ein etwas schlechteres Ausbreitungsverhalten beobachtet werden als für die entsprechende Emulgatorlösung (Kontaktwinkel $90,5 \pm 0,5^\circ$; vgl. auch Oberflächenspannungsmessungen).

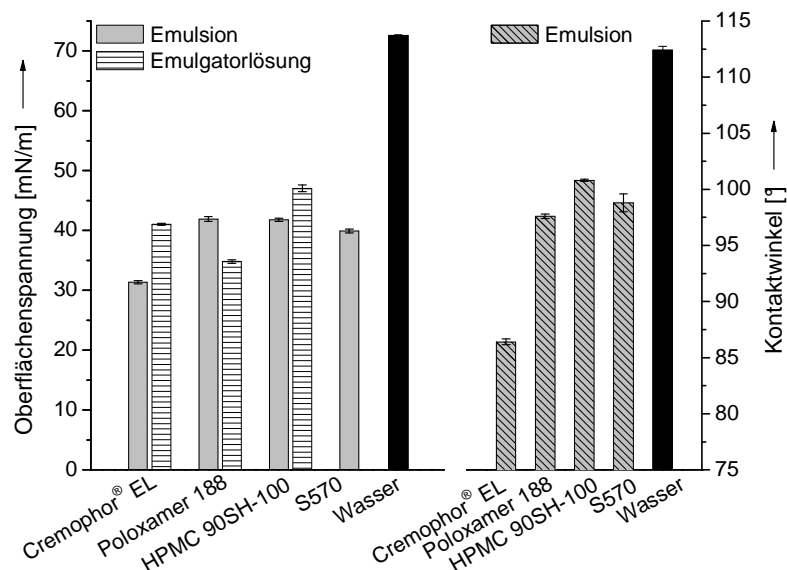


Abb. 4-25: Einfluss des Emulgators auf das Benetzungsverhalten von 35%igen M500-Siliconölemulsionen; *links*: Oberflächenspannung der Emulsionen und der reinen Emulgatorlösungen; *rechts*: Kontaktwinkel der Emulsionen auf einem mit anorganischem Nanosol beschichteten Objektträger

Ein entgegengesetztes Verhalten wurde bei den Cremophor® EL-Proben festgestellt (Kontaktwinkel Emulsion $85,9 \pm 0,6^\circ$ / Emulgatorlösung $88,6 \pm 0,1^\circ$). Hier wies die Cremophor® EL-stabilisierte Emulsion einen geringeren Kontaktwinkel auf.

Des Weiteren wurde die Oberflächenspannung von Wacker Belsil® DMC 6031- und HSY 115-stabilisierten Emulsionen ermittelt. Da jedoch HSY 115-Formulierungen mit 35 % Siliconöl schwer herzustellen sind (siehe auch Kapitel 4.1.2.3), wurden die Emulsionen mit einem M500-Gehalt von nur 10 % untersucht. Die HSY 115- und Wacker Belsil® DMC 6031-Emulsionen wurden mit 10 % Siliconöl, aber 2 % Emulgator hergestellt. Die anderen Proben (Cremophor® EL, Poloxamer 188) waren wie in Tab. 4-9 zusammengesetzt und wurden mit Wasser auf einen Siliconölgehalt von 10 % verdünnt.

Die Emulsionen mit den beiden PEG/PPG-Dimeticonen zeigen ein sehr ähnliches Verhalten. Sowohl die HSY 115-stabilisierte wie auch die mit Belsil® DMC 6031 stabilisierte Emulsion besitzt eine geringere Oberflächenspannung als die reine Emulgatorlösung, die vergleichbar sind mit der Oberflächenspannung der 10%igen Cremophor® EL-stabilisierten M500-Emulsion. Das Verhalten der verdünnten Cremophor® EL- und Poloxamer 188-Proben entspricht dem der 35%igen Zubereitungen (siehe Abb. 4-26, *links*).

Zur besseren Differenzierung der Unterschiede zwischen den beiden PEG/PPG-Dimeticon-Emulsionen wurden ergänzend ihre Kontaktwinkel auf einem hydrophoben Objektträger ermittelt. In Abb. 4-26 (*rechts*) ist zu erkennen, dass die HSY 115-Emulsion einen etwas geringeren Kontaktwinkel als die Belsil® DMC 6031-stabilisierte Emulsion aufweist (signifikanter Unterschied; Signifikanzniveau $p=0,05$). Beide Emulsionen zeigen jedoch ein sehr gutes Ausbreitungsverhalten.

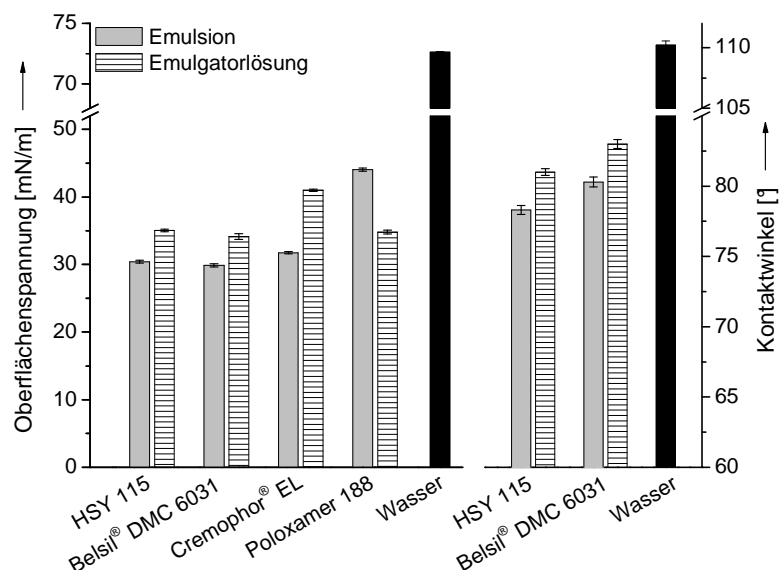


Abb. 4-26: Einfluss des Emulgators auf das Benetzungsverhalten von 10%igen M500-Siliconölemulsionen; *links:* Oberflächenspannung der Emulsionen und der reinen Emulgatorlösungen; *rechts:* Kontaktwinkel der Emulsionen und der reinen Emulgatorlösungen auf einem mit anorganischem Nanosol beschichteten Objektträger

4.3.2 Einfluss der Ölkomponente

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss der Ölkomponente auf das Ausbreitungsverhalten der Emulsionen näher betrachtet. Dazu wurden sieben Siliconöle unterschiedlicher Viskosität sowie zwei weitere pharmazeutische Öle als O/W-Emulsionen mit Cremophor® EL als Stabilisator formuliert (Zusammensetzung s. Tab. 4-9). Von allen Emulsionen erfolgte anschließend die Bestimmung der Oberflächenspannung (Abb. 4-27; *Balkendiagramm*).

Die Oberflächenspannungen der Emulsionen, die mit den pharmazeutischen Ölen Paraffinum perliquidum und Miglyol® 812 hergestellt wurden, waren deutlich höher als die der Siliconölemulsionen. Eine signifikante Differenzierung zwischen den Siliconölemulsionen hinsichtlich ihrer Oberflächenspannung ist jedoch nicht möglich.

Dagegen zeigen die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen (Abb. 4-27; *Punktdiagramm*), dass die Formulierungen mit den niedrig und mittel viskosen Siliconölen M10, M50 und M500 einen signifikant geringeren Kontaktwinkel und somit eine etwas bessere Benetzung der Oberfläche als die M5000-Emulsion aufweisen (Messungen wurden auf lipidierten und Nanosol-beschichteten Objektträgern durchgeführt).

Die Messungen wurden mehrfach wiederholt und bestätigt. Es konnten jedoch nur Kontaktwinkel von Proben verglichen werden, die auf demselben Objektträger bestimmt wurden. Die Oberflächenbeschaffenheit der Objektträger variierte zwar nur gering (Kontaktwinkel Wasser 109°-112°), aber auch die Kontaktwinkel der Formulierungen unterschieden sich nur um wenige Grad.

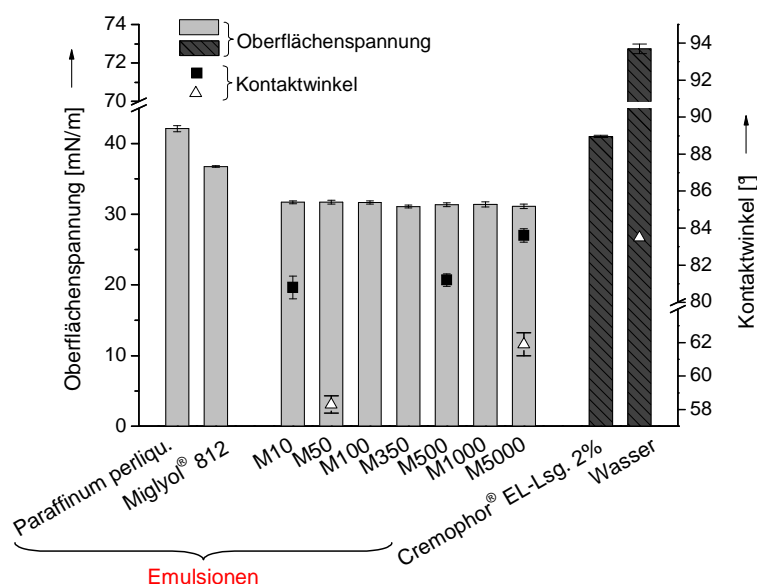


Abb. 4-27: Oberflächenspannung und Kontaktwinkel von Emulsionen mit verschiedenen Ölkomponenten (Ölkomponente 35 %; Cremophor® EL 2 %; Wasser ad 100 % (m/m)); *Balkendiagramm:* Oberflächenspannung (n=6); *Punktdiagramm:* Kontaktwinkel (n=3-4); ■ auf Nanosol beschichteten Objektträgern, Δ auf lipidierten Objektträgern

Ergänzend wurde die Oberflächenspannung von 4 reinen Ölen bestimmt. Für das Siliconöl M10 wurde eine geringere Oberflächenspannung als für das Siliconöl M5000 gemessen. Dieses Ergebnis korreliert mit den Erkenntnissen aus den Kontaktwinkelmessungen, bei denen eine etwas bessere Ausbreitung der Emulsionen mit niedrig viskosen Siliconölen zu beobachten war. Die Oberflächenspannungen von Miglyol® 812 und Paraffinum perliquidum waren wie zu erwarten deutlich größer als die der beiden Siliconöle M10 und M5000 (Tab. 4-10).

Tab. 4-10: Gemessene Oberflächenspannungen der reinen Ölkomponenten

Ölkomponente	Oberflächenspannung [mN/m]
Siliconöl M10	19,6 ± 0,2
Siliconöl M5000	20,3 ± 0,1
Miglyol® 812	29,8 ± 0,1
Paraffinum perliquidum	30,2 ± 0,2

Die Oberflächenspannung der Cremophor® EL-stabilisierten Siliconölemulsion (~31 mN/m) ist zwischen der Oberflächenspannung des reinen Siliconöls (~20 mN/m) und der reinen Emulgatorlösung (~41 mN/m) einzuordnen. Somit ist die erniedrigte Oberflächenspannung der Emulsion wahrscheinlich nicht nur durch den freien Emulgator in der wässrigen Lösung bedingt, sondern auch auf die dispergierten Ölpartikel zurückzuführen.

Da zu erwarten ist, dass die Siliconöltropfen von einem Emulgatorfilm vollständig umschlossen werden, sollte die Oberflächenspannung der Emulsion nur durch die wässrige Phase mit dem Emulgator beeinflusst werden. Demzufolge könnte man vermuten, dass die emulgierte Ölkomponente

nur einen geringen bzw. keinen Einfluss auf die Grenzflächeneigenschaften der Emulsion aufweist. Da jedoch beispielsweise die Oberflächenspannung der Cremophor® EL-stabilisierten Siliconölemulsion deutlich geringer als die der reinen Emulgatorlösung ist, wurde untersucht, ob auch freies Siliconöl in der wässrigen Phase gelöst bzw. in Mizellen solubilisiert vorliegt, das eventuell für die verminderte Oberflächenspannung der Emulsion verantwortlich sein könnte. Hierzu wurden ausgewählte Siliconöle, Miglyol® 812 und Paraffinum perliquidum (je 35 Teile) sowohl mit reinem Wasser (ohne Emulgatorzusatz, 65 Teile) sowie mit einer 2%igen Cremophor® EL-Lösung (65 Teile) 20 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt (185 U/min). Anschließend wurde die wässrige Phase abgetrennt und deren Oberflächenspannung bestimmt. Die Messungen zeigten, dass das mit den verschiedenen Ölkomponenten geschüttelte Wasser bzw. die Emulgatorlösungen keine deutliche Veränderung der Oberflächenspannung im Vergleich zu den unbehandelten wässrigen Phasen aufwiesen (siehe Tab. 4-11). Die Ergebnisse bestätigen die Angaben der Literatur, in der eine Unlöslichkeit von Siliconölen in Wasser beschrieben wird (45) und schließen außerdem eine Solubilisierung des Siliconöls in Mizellen aus. Die Vermutung, dass die verminderte Oberflächenspannung einer Cremophor® EL-stabilisierten Siliconölemulsion im Vergleich zur reinen Emulgatorlösung durch emulgiertes und nicht durch freies Siliconöl verursacht wird, konnte somit bekräftigt werden.

Tab. 4-11: Oberflächenspannung der abgetrennten wässrigen Phasen (Wasser bzw. 2%ige Cremophor® EL-Lösung), die 20 h mit einer Ölkomponente geschüttelt wurden

Ölkomponente	Oberflächenspannung [mN/m]	
	Öl 20 h geschüttelt mit	
	Wasser (72,53 ± 0,13)	Cremophor® EL-Lsg. 2 % (40,90 ± 0,13)
M10	72,52 ± 0,18	40,63 ± 0,10
M500	72,59 ± 0,12	40,64 ± 0,08
M1000	72,52 ± 0,26	40,92 ± 0,07
M5000	72,39 ± 0,14	40,75 ± 0,25
Miglyol® 812	72,32 ± 0,11	39,20 ± 0,10
Paraffinum perliquidum	72,54 ± 0,15	40,81 ± 0,27

4.3.3 Einfluss der Siliconölkonzentration

In Abschnitt 4.3.1 konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Oberflächenspannungen einer 35%igen und einer 10%igen (Verdünnung mit Wasser) Siliconölemulsion, stabilisiert mit Cremophor® EL, nicht signifikant voneinander unterscheiden. Von Interesse war nun die Fragestellung, ob der oberflächenspannungsreduzierende Effekt auch bei geringeren Siliconölkonzentrationen erhalten bleibt.

Um den Einfluss der Ölkonzentration zu beurteilen, wurde eine 35%ige M500-Emulsion (stabilisiert mit 2 % Cremophor® EL) mit Wasser bzw. einer 2%igen Cremophor® EL-Lösung bis zu einer Siliconölkonzentration von 0,01 % verdünnt. Durch das Verdünnen der Emulsion mit der Emulgator-

lösung konnte ein Effekt durch die verringerte Emulgatorkonzentration bzw. ein Unterschreiten der CMC ausgeschlossen werden.

Die Abhängigkeit der Oberflächenspannung von der Siliconölkonzentration ist in Abb. 4-28 dargestellt. Die Oberflächenspannungen der beiden Reihen, die mit verschiedenen Verdünnungsmedien hergestellt wurden, unterscheiden sich bis zu einer Siliconölkonzentration von 1 % nur gering. Verdünnt man die Emulsionen jedoch weiter, ist bei einer Ölkonzentration von 0,1 % bereits ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Proben zu erkennen. Interessant ist auch, dass die 0,1 %- und 0,035%igen Emulsionen, die mit Wasser verdünnt wurden, immer noch eine geringere Oberflächenspannung als die reine Emulgatorlösung aufweisen. Erst bei einer Konzentration von nur noch 0,01 % Siliconöl M500, einer sehr starken Verdünnung der Probe, wird die Oberflächenspannung der reinen Emulgatorlösung überschritten (Verdünnung mit Wasser) bzw. erreicht (Verdünnung mit Cremophor® EL 2 %). Die Oberflächenspannung der 0,01 %-Probe, verdünnt mit einer 2%igen Cremophor® EL-Lösung, unterscheidet sich nicht signifikant von der Oberflächenspannung der reinen Emulgatorlösung.

Durch die starke Verdünnung der Emulsion konnte gezeigt werden, dass der oberflächenspannungsreduzierende Effekt, bedingt durch das dispergierte Siliconöl, auch bei sehr geringen Ölkonzentrationen noch zu beobachten ist.

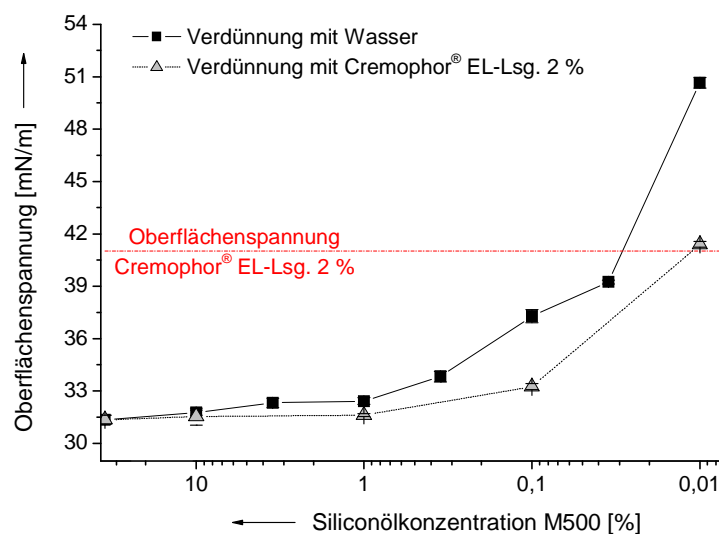


Abb. 4-28: Einfluss der Siliconölkonzentration M500 auf die Oberflächenspannung der untersuchten Emulsion (Stammemulsion: M500 35 %; Cremophor® EL 2 %; Wasser ad 100 % (m/m)) in Abhängigkeit vom Verdünnungsmedium (Wasser bzw. 2%ige Cremophor® EL-Lösung)

4.3.4 Einfluss der Partikelgröße

In den bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Siliconöltropfen das Ausbreitungsverhalten der Emulsionen beeinflussen. Es ist denkbar, dass die Siliconöltropfen auf der hydrophoben Oberfläche spreiten und ein Filmbildungseffekt auftritt. Ausgehend von dieser Annahme, wurde der

Einfluss der Partikelgröße der Emulsion untersucht, da größere Tropfen einen höheren Impuls besitzen und somit leichter auf Oberflächen spreiten könnten (Vergleich von Siliconöltropfen gleicher Viskosität). Für die Untersuchung dieses Parameters wurde eine Siliconölemulsion (M500 35 %; Cremophor® EL 2 %; Wasser ad 100 % (m/m)) unter Variation der Herstellungsbedingungen dreimal formuliert (Tab. 4-12). Die Emulsionen werden im Folgenden als E1, E2 und E3 bezeichnet und unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Partikelgröße (Tab. 4-12; Abb. 4-29, *rechts*).

Der Kontaktwinkel der drei Siliconölemulsionen E1, E2 und E3 wurde zur Beurteilung des Benetzungsverhaltens auf einem mit anorganischem Nanosol beschichteten Objektträger bestimmt (Abb. 4-29, *links*). Die Emulsionen E1 und E2 unterscheiden sich nicht signifikant in ihren Spreitungseigenschaften. Nur bei der Emulsion E3, die deutlich größere Partikel aufweist, wurde ein signifikant kleinerer Kontaktwinkel als bei E1 und E2 gemessen. Die Emulsion E3 mit den größten Siliconölteilchen zeigte somit die beste Ausbreitung auf der hydrophoben Glasoberfläche.

Tab. 4-12: Herstellungsbedingungen und Partikelgröße der drei untersuchten Emulsionen (siehe auch Abb. 4-29, *rechts*)

	Herstellungsbedingungen	Median [μm]	D99 [μm]
E1	<ul style="list-style-type: none"> · Voremulgierung mittels Ultra-Turrax® T8 · Hochdruckhomogenisation 10 Zyklen á 700 bar 	1,52	6,48
E2	<ul style="list-style-type: none"> · Voremulgierung mittels Ultra-Turrax® T8 · Hochdruckhomogenisation 1 Zyklus á 100 bar 	9,21	68,89
E3	<ul style="list-style-type: none"> · Emulgierung mittels Ultra-Turrax® T8 	32,89	126,7

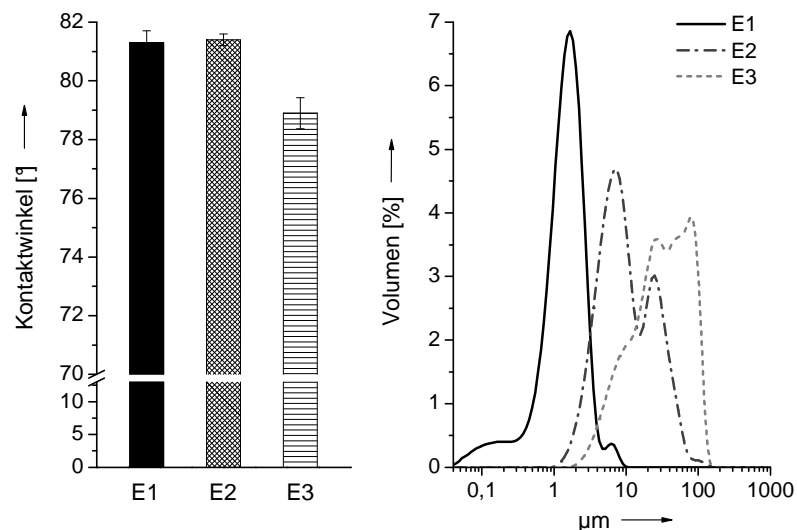


Abb. 4-29: Einfluss der Partikelgröße der Emulsion auf das Ausbreitungsverhalten; *links*: Kontaktwinkel der Emulsionen E1, E2 und E3 auf einem hydrophoben Objektträger; *rechts*: Volumenbezogene Teilchengrößenverteilungen der Emulsionen E1, E2 und E3

Die beobachteten Unterschiede im Benetzungsverhalten zwischen den Siliconölemulsionen mit unterschiedlichen Partikelgrößen sind nur sehr gering, aber dennoch statistisch signifikant. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass Emulsionen mit großen Partikeln im Vergleich zu feindispersen Formulierungen ein besseres Benetzungsverhalten aufweisen.

4.3.5 Zusammenfassung

Durch die Variation verschiedener Parameter ist es möglich, Einfluss auf das Benetzungsverhalten der untersuchten Emulsionen zu nehmen. Siliconölemulsionen weisen im Vergleich zu Formulierungen mit anderen pharmazeutischen Ölen signifikant geringere Oberflächenspannungen und Kontaktwinkel auf. Dieser Effekt konnte auch bei den reinen Siliconölen (M10 und M5000) im Vergleich zu Paraffinum perliquidum und Miglyol® 812 beobachtet werden.

Außerdem kann auch die Viskosität des zur Herstellung der O/W-Emulsion eingesetzten Siliconöls die Ausbreitung der Emulsion beeinflussen. Die Emulsion mit dem höher viskosen Siliconöl M5000 zeigt ein etwas schlechteres Benetzungsverhalten als die Zubereitungen mit den niedriger viskosen Siliconölen M10, M50 und M500. Da die M5000-Emulsion aufgrund der hohen Viskosität des Siliconöls die größten Partikel aufweist (siehe auch Kapitel 4.1.2.1), könnte man vermuten, dass dieser Effekt auch auf die großen Partikel der Emulsion zurückgeführt werden kann. Die Untersuchungen zum Einfluss der Partikelgröße zeigen jedoch deutlich, dass nur bei sehr großen Partikeln ($D_{50}=32,89\text{ }\mu\text{m}$) das Benetzungsverhalten geringfügig beeinflusst wird. Außerdem erfolgt durch große Partikel eine bessere Benetzung der Oberfläche. Somit kann der in Kapitel 4.3.2 beschriebene Effekt eindeutig der höheren Viskosität des Siliconöls M5000 und nicht der Partikelgröße zugeordnet werden. Die grobdisperse Formulierung E3 breitet sich auf den hydrophoben Oberflächen etwas besser aus als die feindispersen Emulsionen E1 und E2.

Interessant ist auch, dass der oberflächenspannungsreduzierende Effekt der Siliconölemulsion bis zu einer Ölkonzentration von 0,1 % erhalten bleibt. Doch nicht nur der Öltyp, sondern auch der zur Stabilisierung der Emulsion eingesetzte Emulgator beeinflusst die Ausbreitung der Emulsion.

Vergleicht man die Methoden der Kontaktwinkel- bzw. Oberflächenspannungsmessung, so wurde für die Bestimmung des Kontaktwinkels eine größere Empfindlichkeit beobachtet. Proben, die sich hinsichtlich ihrer Oberflächenspannung nicht signifikant unterschieden, konnten teilweise mittels Kontaktwinkelmessung differenziert werden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass Siliconölemulsionen mit niedriger viskosen Siliconölen, großen Partikeln, bestimmten Emulgatoren (siehe Kapitel 4.3.1) und einer Siliconölkonzentration von mindestens 1 % die besten Ausbreitungseigenschaften besitzen. Die Partikelgröße der Emulsionen sollte jedoch so gewählt werden, dass noch eine ansprechende Lager- und Autoklavierstabilität der Zubereitungen gewährleistet ist.

Durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen ist es möglich, Siliconölemulsionen, die ein besonders gutes Ausbreitungsverhalten besitzen, zu selektieren. Das Ausbreitungsverhalten der Siliconölemulsi-

onen auf den hydrophoben Nanosol-beschichteten und auf den lipidierten Objektträgern, die eine zellähnlichen Oberfläche aufweisen, war vergleichbar (siehe Abb. 4-27). Demzufolge sollten ausgewählte Siliconölemulsionen auch für die Beeinflussung von bestimmten Grenzflächen-abhängigen Prozessen im menschlichen Körper gut geeignet sein. Die Grenzflächeneigenschaften der lipidierten Objektträger sind beispielsweise annähernd mit den Zelloberflächen von gramnegativen Bakterien sowie entzündeten Stellen im Darm, an denen die schützende Schleimschicht des Darm-epithels geschädigt ist, zu vergleichen. Folglich könnte man vermuten, dass Siliconölemulsionen mit gutem Ausbreitungsverhalten auf hydrophoben Grenzflächen auch für die angestrebte Therapie der CED viel versprechend sind.

Diese Untersuchungen haben jedoch nur Modellcharakter, da im Darm andere Bedingungen (z.B. andere Zusammensetzung bzw. Fehlen der Gasphase) als bei den experimentellen Untersuchungen vorherrschen. Dennoch könnten die gewonnen Ergebnisse einen Ansatz darstellen, Emulsionen mit einem möglichen therapeutischen Potenzial zu selektieren.

4.4 Mikrobiologische Untersuchungen

Eine antimikrobielle Aktivität von reinen Siliconölen gegen verschiedene Mikroorganismen (z.B. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. niger*) wurde bereits in der Literatur beschrieben (7,8). Für die angestrebte orale Applikation von Siliconölen zur Therapie von CED wurden diese jedoch als O/W-Emulsionen formuliert (siehe auch Kapitel 4.1). Um zu prüfen, ob der beschriebene antimikrobielle Effekt des Siliconöls auch in den O/W-Emulsionen erhalten bleibt, wurde die "Prüfung auf ausreichende Konservierung" (Ph. Eur. 5.1.3.) (210) durchgeführt. Weiterhin konnte somit beurteilt werden, ob eine zusätzliche Konservierung der Emulsionen erforderlich ist oder diese bereits durch das formulierte Siliconöl gewährleistet wird.

4.4.1 Prüfung auf ausreichende Konservierung

Im Rahmen dieser Studie wurde die antimikrobielle Aktivität von vier unterschiedlich stabilisierten M500-Siliconölemulsionen beurteilt. Außerdem wurden eine Sojaölemulsion sowie zwei reine Emulgatorlösungen untersucht, um eventuell auftretende antimikrobielle Effekte der Siliconöl-haltigen Zubereitungen besser zuordnen zu können. Die Herstellung der Emulsionen erfolgte unter Anwendung der Standardprozessparameter (siehe Kapitel 4.1.1.3). Weiterhin wurde als Kontrolle das Wachstum der Mikroorganismen in dem entsprechenden Nährmedium sowie in gepufferter Natriumchloridlösung (Verdünnungsmedium) geprüft. Alle untersuchten Proben und die Zusammensetzung der Emulsionen sowie der Median ihrer Teilchengrößenverteilungen sind in Tab. 4-13 dargestellt.

Tab. 4-13: Übersicht der untersuchten Emulsionen (Zusammensetzung und Median-Werte der Teilchengrößenverteilungen (Bestimmung mittels Laserdiffraktometrie) nach der Autoklavierung der Proben (nA); n=3 (Sojaölemulsion n=2)) sowie der Emulgator- und Kontrolllösungen

Emulsionen				
<u>Ölkomponente</u>		<u>Emulgator</u>	<u>Wasser</u>	<u>Median (nA)</u>
Siliconöl M500	35 %	Cremophor® EL	2 %	1,75 ± 0,25 µm
		Poloxamer 188		1,01 ± 0,17 µm
		Zuckerester S570		1,66 ± 0,66 µm
		HPMC 90SH-100		2,57 ± 0,23 µm
Sojaöl	35 %	Poloxamer 188	2 %	ad 100 %
Emulgatorlösungen		· 2 % Poloxamer 188 in Wasser · 2 % Zuckerester S570 in Wasser		
Kontrolllösungen		· gepufferte Natriumchloridlösung (Verdünnungsmedium) · flüssiges Nährmedium (Brain Heart Infusion bzw. Sabouraud Medium)		

Die Durchführung der Untersuchungen fand in Anlehnung an das Europäische Arzneibuch, Methode 5.1.3 (210), statt, wobei im Versuchsablauf geringe praktisch bedingte Änderungen vorgenommen

wurden. Vor Versuchsstart erfolgte das Autoklavieren aller Proben, damit eine mikrobielle Kontamination ausgeschlossen werden konnte.

Die Ergebnisse der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ mit den 4 Mikroorganismen *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. niger* und *C. albicans* sind im Folgenden zusammengefasst.

4.4.1.1 *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*

Zunächst soll die Empfindlichkeit des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) sowie des gramnegativen Keims *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) gegenüber den verschiedenen untersuchten Proben (Tab. 4-13) aufgezeigt werden. Die log-Keimzahlreduktion 1, 7, 14 und 28 Tage nach Inokulation der Zubereitungen ist in Abb. 4-30 dargestellt.

Bereits nach 7 Tagen war in den Poloxamer 188- und Cremophor® EL-stabilisierten Siliconöl- und in der Sojaölemulsion eine vollständige Keimzahlreduktion von *S. aureus* nachweisbar (siehe Abb. 4-30, oben). In den mit *P. aeruginosa* beimpften Siliconölemulsionen mit diesen beiden Emulgatoren konnte sogar schon 24 h nach Versuchsstart kein lebender Keim mehr identifiziert werden, jedoch trat in der Sojaölemulsion auch erst nach 7 Tagen eine vollständige Keimzahlreduktion von *P. aeruginosa* auf (Abb. 4-30, unten).

Diese drei Emulsionen zeigten nach 14 Tagen für beide Bakterienarten eine Reduktion der Keimzahl um mehr als 5 Zehnerpotenzen und auch nach 28 Tagen konnte keine erneute Zunahme der KBE/ml beobachtet werden. Die Anforderungen der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (Ph. Eur. 5.1.3) (210) für Zubereitungen zum Einnehmen sind somit für die Poloxamer 188- und Cremophor® EL-stabilisierten Siliconöl- bzw. Sojaölemulsionen hinsichtlich *S. aureus* und *P. aeruginosa* erfüllt.

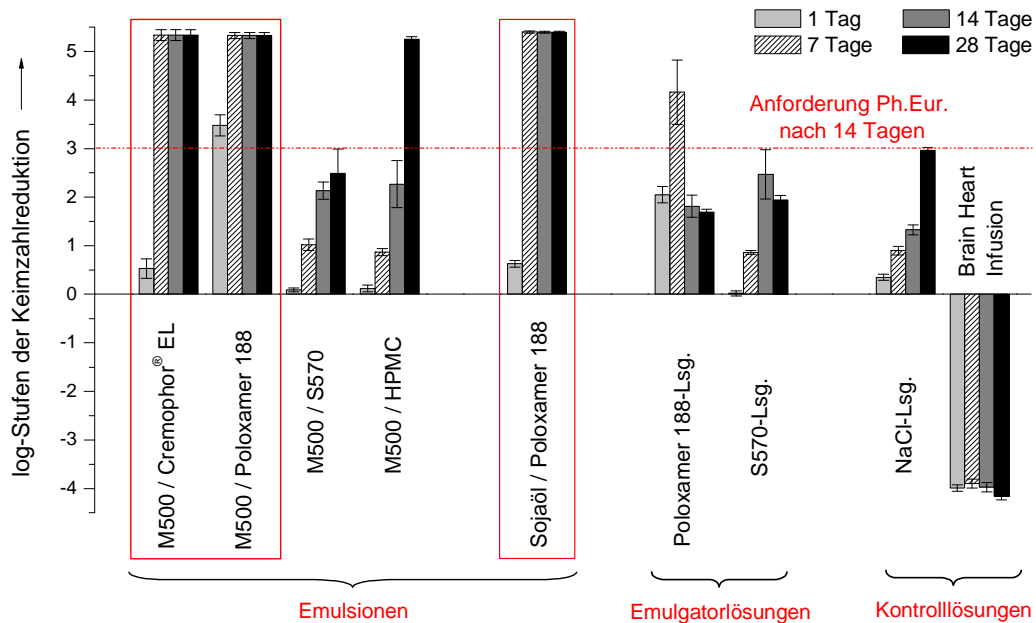
Alle weiteren mit *S. aureus* beimpften Proben wiesen, mit Ausnahme des flüssigen Nährmediums, auch bereits nach einem Tag eine Keimzahlreduktion auf. Diese nahm im Verlauf der 28 Versuchstage weiter zu, entsprach jedoch nicht den geforderten Kriterien des Ph. Eur. Die Keimzahl im flüssigen Nährmedium (Brain Heart Infusion) dagegen wies auch nach 28 Tagen noch eine Steigerung der Ausgangskeimzahl um mehr als 4 log-Stufen auf und spiegelte somit die Vitalität und Vermehrungsfähigkeit des eingesetzten *S. aureus*-Stammes gut wider.

Im Gegensatz zu den mit *S. aureus* beimpften S570- und HPMC-Emulsionen sowie den Emulgator- und NaCl-Lösungen zeigten die entsprechenden *P. aeruginosa*-Proben keine Abnahme, sondern eine geringe Zunahme der Keimzahl (ca. 10^1 - 10^2 KBE/ml) in Bezug auf die Startkonzentration (Abb. 4-30, unten). Ein deutlicher Anstieg der Keimzahl von *P. aeruginosa* war auch hier, wie zu erwarten, im flüssigen Nährmedium festzustellen.

Bei beiden Bakterienarten konnte beobachtet werden, dass die vier Siliconölemulsionen, die sich in ihrer Zusammensetzung nur hinsichtlich des Emulgators unterscheiden, deutlich unterschiedliche antibakterielle Eigenschaften besitzen. Die HPMC- und S570-stabilisierten M500-Emulsionen zeigten eine deutlich geringere Reduktion bzw. eine Zunahme der Anzahl an KBE/ml von *S. aureus* und

P. aeruginosa im Vergleich zu den mit Poloxamer 188 und Cremophor® EL hergestellten Emulsionen. Somit ist es wahrscheinlich, dass der eingesetzte Emulgator die antibakterielle Aktivität der Emulsion und somit die Lebensfähigkeit der Bakterien beeinflusst.

Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa

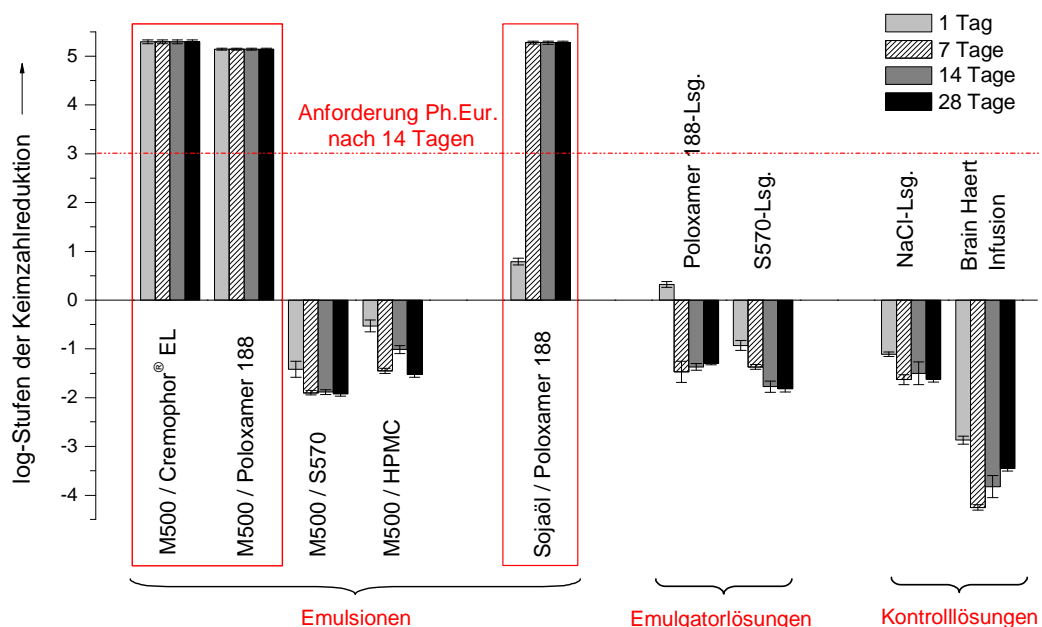


Abb. 4-30: Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion in den untersuchten Proben nach 1, 7, 14 und 28 Tagen (n=2-4); rot eingerahmte Proben entsprechen den Anforderungen des Ph. Eur. 5.1.3 für Zubereitungen zum Einnehmen; eine vollständige Keimabtötung tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 5,1-5,4 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben); *oben*: Inokulation mit *Staphylococcus aureus*; *unten*: Inokulation mit *Pseudomonas aeruginosa*

Die 2%ige Lösung von Poloxamer 188 in Wasser erfüllt im Gegensatz zur entsprechenden Siliconöl- bzw. Sojaölemulsion nicht die Anforderungen des Ph.Eur. Eine antibakterielle Wirkung der Poloxamer 188-Lösung ist, wie auch bei der S570-Lösung, nur gering ausgeprägt (*S. aureus*) bzw. nicht vorhanden (*P. aeruginosa*). Für verschiedene Saccharoseester (0,1-1,0%ige Lösungen) wird jedoch eine antibakterielle Wirkung in der Literatur beschrieben (208,289,290). Die antibakterielle Aktivität, die vermutlich auf eine Interaktion des Saccharoseesters mit der Zellmembran zurück zu führen ist, konnte insbesondere für die Saccharoseester der Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure sowie für Monoester beobachtet werden (290,291). Der untersuchte Saccharoseester S570 enthält jedoch als Lipidkomponente Stearinsäure und weist einen hohen Anteil an Di-, Tri- und Polyestern (ca. 70 %) auf (208). Möglicherweise ist dies die Ursache für die nur schwach ausgeprägt bzw. nicht vorhandene antibakterielle Wirkung der 2%igen S570-Lösung bzw. der S570-stabilisierten Siliconölemulsion.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse kann der antibakterielle Effekt der Poloxamer 188- und Cremophor® EL-stabilisierten Siliconöl- bzw. Sojaölemulsionen nicht auf die alleinige Anwesenheit des Emulgators zurückgeführt werden, denn auch die Anwesenheit einer dispergierten Ölkomponente scheint eine bedeutende Rolle einzunehmen.

Erst durch die Kombination von Ölkomponente und Emulgator (Formulierung der Emulsion) tritt eine antibakterielle Wirkung der Probe auf. In diesen Untersuchungen ist jedoch der Effekt nicht nur auf Emulsionen mit Siliconöl als disperse Phase beschränkt, sondern war auch bei der Sojaöl-haltigen Formulierung zu beobachten.

Die Bakterienarten *S. aureus* und *P. aeruginosa* weisen beide hinsichtlich ihrer Vitalität eine Empfindlichkeit gegenüber den Poloxamer 188- und Cremophor® EL-stabilisierten Emulsionen auf. In den weiteren untersuchten Proben verhalten sie sich jedoch unterschiedlich (Ausnahme: flüssiges Nährmedium - Brain Heart Infusion). So war bei *S. aureus* eine geringe Abnahme, bei *P. aeruginosa* dagegen eine leichte Zunahme der Keimkonzentration in den Proben zu beobachten. Dieses kontroverse Verhalten der beiden Bakterienspezies in den gleichen Zubereitungen könnte im unterschiedlichen Aufbau der grampositiven (*S. aureus*) und gramnegativen (*P. aeruginosa*) Zellwand begründet sein (siehe Abb. 4-31).

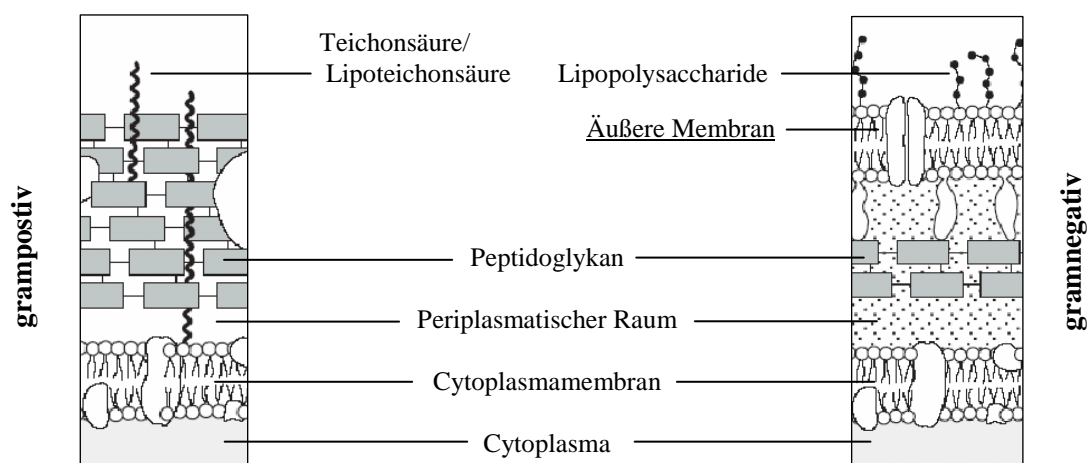


Abb. 4-31: Aufbau der grampositiven und gramnegativen Bakterienzellwand (292)

Die Zellwand von gramnegativen Bakterien besteht nur aus einer dünnen Peptidoglykanschicht, der jedoch eine weitere Membran aufgelagert ist (Abb. 4-31). Diese äußere Membran, die bei den grampositiven Bakterien fehlt, fungiert als zusätzliche Barriere zwischen Umgebung und Cytoplasma. Die Zelloberfläche ist dadurch weniger permeabel und resistenter gegen äußere Einflüsse (293). Mit Hilfe des unterschiedlichen Aufbaus der Zellwand könnte die geringere Empfindlichkeit und die Zunahme der Konzentration von *P. aeruginosa* im Gegensatz zu *S. aureus* in bestimmten Proben erklärt werden. Im Widerspruch dazu steht jedoch die komplette Keimzahlreduktion von *P. aeruginosa* nach einem Tag in den Poloxamer 188- und Cremophor® EL-stabilisierten Siliconölemulsionen, die bei den entsprechenden mit *S. aureus* beimpften Emulsionen erst nach 7 Tagen zu beobachten war.

4.4.1.2 *Candida albicans* und *Aspergillus niger*

Die „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ des Europäischen Arzneibuchs ist nicht auf die beiden Bakterienspezies *S. aureus* und *P. aeruginosa* beschränkt, sondern sollte auch mit den Pilzen *Candida albicans* (ATCC 10231) und *Aspergillus niger* (ATCC 16404) als Testorganismen durchgeführt werden. Zunächst soll die Veränderung der Keimzahl von *C. albicans* in den verschiedenen Proben diskutiert werden (siehe Abb. 4-32, oben).

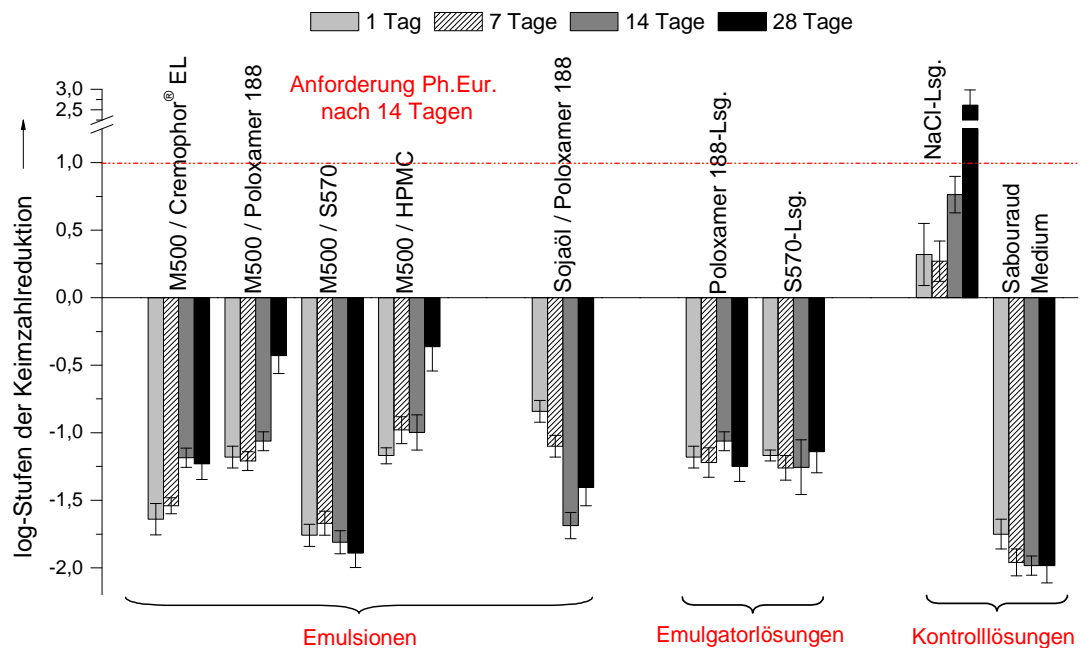
Eine geringe Abnahme der *C. albicans*-Konzentration war nur in der gepufferten NaCl-Lösung zu beobachten. Alle anderen beimpften Proben wiesen auch 28 Tage nach Inokulation eine Zunahme der Keimzahl auf. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit *S. aureus* und *P. aeruginosa* entspricht keine der untersuchten Zubereitungen, die mit *C. albicans* beimpft wurden, den Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs bzw. zeigte eine deutliche antimikrobielle Wirkung gegen den Hefepilz. Überraschend war jedoch die Keimzahlreduktion in der gepufferten Natriumchlorid-Lösung.

Betrachtet man nun die Aktivität der untersuchten Proben gegenüber dem Schimmelpilz *Aspergillus niger*, so war nur für die Poloxamer 188-stabilisierte Siliconölemulsion ein schwacher antimikrobieller Effekt nachweisbar (Abb. 4-32, unten). Diese Emulsion zeigte nach 14 Tagen eine logarithmische Keimzahlreduktion größer 1 bzw. nach 28 Tagen keine erneute Zunahme der Keimkonzentration und entspricht somit hinsichtlich *A. niger* als einzige Zubereitung den Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs. Bei allen weiteren untersuchten Emulsionen und Lösungen waren im Gegensatz zu den *C. albicans*-Proben, bei denen eine Zunahme der Keimzahl (1-2 Zehnerpotenzen) auftrat, nur geringe Veränderungen gegenüber der Startkonzentration zu beobachten.

A. niger und *C. albicans* sind beides Ascomyceten, bei denen die Form der asexuellen Fortpflanzung dominiert. Die beiden Pilze unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Wuchsform bei der asexuellen Vermehrung (294). *A. niger* wächst im Gegensatz zu *C. albicans* durch eine Verlängerung der Hyphenspitzen, so dass sich ein Mycel in alle Richtungen ausbreitet. Jedoch erst wenn das Mycel an die Wasser-Luft-Grenzfläche gelangt, wird die Bildung von Sporen an speziellen morphologischen Einheiten, den Konidiophoren, eingeleitet. Der Hefepilz *C. albicans* dagegen bildet seine Tochterzellen durch Sprossung, ohne dass ein Grenzflächenkontakt nötig ist (294,295). Dies könnte eine

mögliche Erklärung für die stärkere Zunahme der Keimzahl in den mit *C. albicans* beimpften Proben sein.

Candida albicans



Aspergillus niger

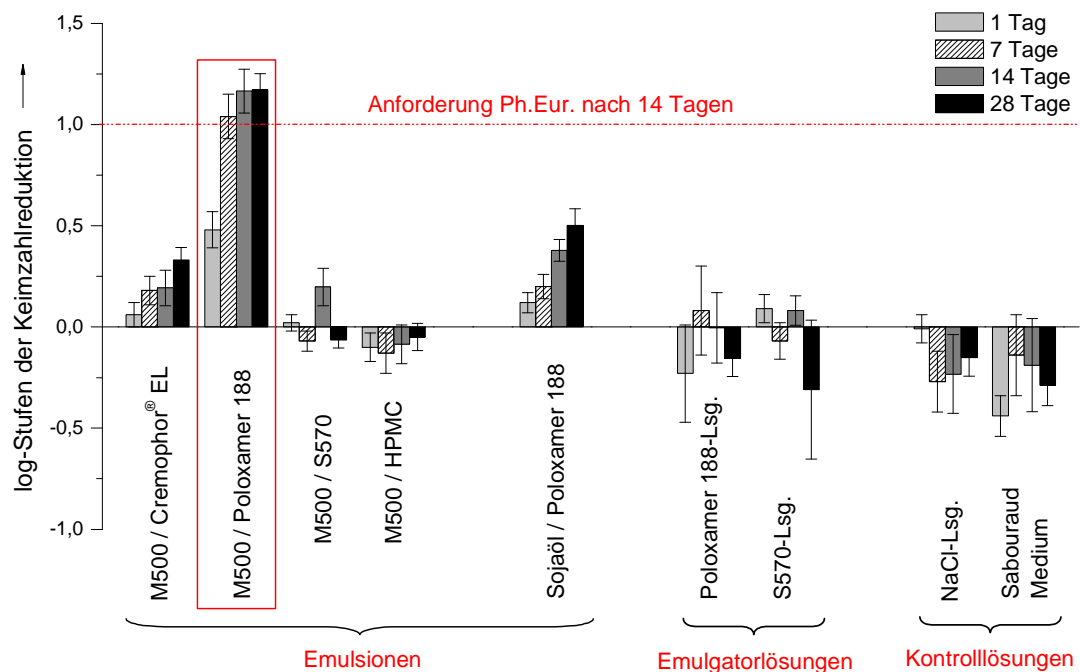


Abb. 4-32: Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion in den untersuchten Proben nach 1, 7, 14 und 28 Tagen (n=2-4); rot eingekreiste Proben entsprechen den Anforderungen des Ph. Eur. 5.1.3 für Zubereitungen zum Einnehmen; eine vollständige Keimabtötung tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 5,3-5,4 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben); oben: Inokulation mit *Candida albicans*; unten: Inokulation mit *Aspergillus niger*

Auffallend waren die teilweise starken Schwankungen der Keimzahl in den mit *A. niger* beimpften Proben. Dies ist auch an den großen Standardabweichungen der errechneten log-Keimzahlreduktionen erkennbar. Einige Zubereitungen haben im Versuchsverlauf ihre makroskopischen Eigenschaften zum Teil stark verändert. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Ausbreitung des Pilzmycels von *A. niger* in den Proben sein. So war aufgrund einer erhöhten Viskosität der S570-stabilisierten Siliconölemulsion sowie der S570-Lösung nur eine ungenaue Entnahme des Probenvolumens möglich (Abb. 4-33; I). Auch in der Cremophor® EL-stabilisierten Siliconölemulsion waren optische Veränderungen sichtbar. Im Versuchsverlauf bildete sich ein viskoser Klumpen, der sich auch durch lang andauerndes Schütteln nicht verteilen ließ (Abb. 4-33; II). So konnte bei der Probenentnahme nur die umgebende Flüssigkeit berücksichtigt werden. Eine leichte Braunfärbung dagegen wurde nach 28 Tagen in den Poloxamer 188- und HPMC-stabilisierten Emulsionen beobachtet. Das filamentöse Wachstum (braunes Mycel) von *Aspergillus niger* war insbesondere in der Poloxamer 188-Lösung nach Beimpfung und Lagerung gut sichtbar (Abb. 4-33; III). Auch an der Oberfläche der Sojaölemulsion konnte man braune Öltropfen erkennen, die auf eine auftretende Instabilität der Emulsion hinweisen. Eine deutliche Sporenbildung an der Grenzfläche Flüssigkeit-Luft war dagegen nur im flüssigen Nährmedium sichtbar, dennoch kam es auch hier nach 28 Tagen zu keinem deutlichen Anstieg der Keimzahl. Diese optischen Veränderungen der Proben waren nur nach Inokulation mit *Aspergillus niger* zu beobachten und traten nach Beimpfung der Proben mit den anderen Testorganismen (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*) nicht auf.

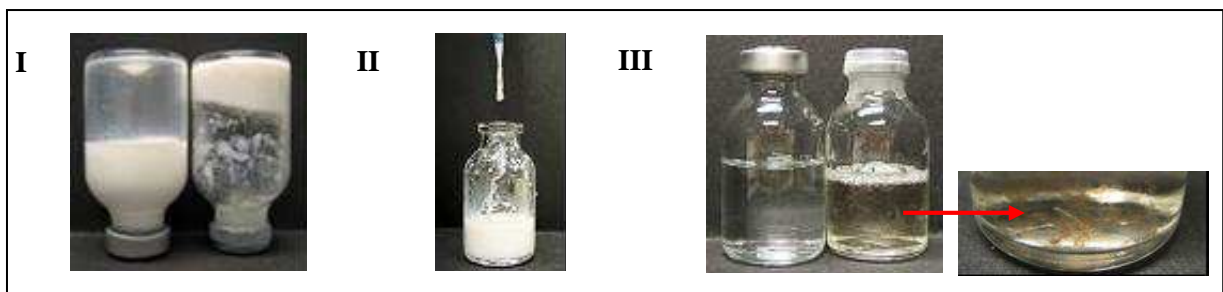


Abb. 4-33: Sichtbare Veränderungen der Proben nach Inokulation mit *A. niger* und anschließender Lagerung bei 20-25°C; **I** - S570-stabilisierte Siliconölemulsion nach 28 Tagen Lagerung, *links*: unbehandelte Emulsion; *rechts*: beimpfte Emulsion; **II** - Schleimfaden in Cremophor® EL-stabilisierter Siliconölemulsion 28 Tage nach Inokulation; **III** - 2%ige Poloxamer 188-Lösung, *links*: unbehandelte Probe; *rechts*: Mycelbildung 28 Tage nach Inokulation

4.4.1.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass keine der geprüften Emulsionen und Lösungen unter Einbeziehung aller 4 Testorganismen den Anforderungen der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (Ph. Eur.) für Zubereitungen zum Einnehmen entsprechen (siehe Tab. 4-14).

Die Poloxamer 188-stabilisierte Siliconölemulsion erfüllte als einzige untersuchte Probe die vom Europäischen Arzneibuch geforderten Kriterien für die beiden Bakterienspezies sowie für den Schimmelpilz *A. niger*, jedoch nicht für *C. albicans*.

Tab. 4-14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Prüfung auf ausreichende Konservierung Ph. Eur. (+ Kriterien erfüllt/ – nicht erfüllt für Zubereitungen zum Einnehmen)

	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	Anforderung Ph. Eur. erfüllt
Emulsionen					
M500-Cremophor® EL	+	+	–	–	nein
M500-Poloxamer 188	+	+	–	+	nein
M500-S570	–	–	–	–	nein
M500-HPMC 90SH-100	–	–	–	–	nein
Sojaöl-Poloxamer 188	+	+	–	–	nein
Emulgatorlösungen					
Poloxamer 188-Lsg. 2 %	–	–	–	–	nein
S570-Lsg. 2 %	–	–	–	–	nein

Auch bei der Sojaölemulsion sowie bei der mit Cremophor® EL hergestellten Siliconölemulsion konnte bei *S. aureus* und *P. aeruginosa* eine vollständige Keimzahlreduktion beobachtet werden. Alle anderen Proben entsprachen für keinen Testorganismus der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“. Die untersuchten Proben besitzen somit keine ausreichenden konservierenden Eigenschaften. Aus diesem Grund wäre eine Autoklavierung und Konservierung der Proben bzw. eine Abfüllung in Einmaldosenbehältnisse für die Lagerung der Proben sinnvoll, um eine möglichst geringe mikrobielle Kontamination und folglich eine gute Haltbarkeit der Emulsionen zu erzielen.

Der für reines Siliconöl beschriebene antimikrobielle Effekt, der in der Literatur auf einen Nahrungsentzug der Mikroorganismen und eine toxische Wirkung des Siliconöls zurückgeführt wird (7), bleibt also nur in bestimmten Emulsionsformulierungen erhalten. Da in den reinen Emulgatorlösungen nur bei *S. aureus* eine geringe Keimzahlreduktion auftrat, kann die Wirkung nicht nur auf den Nahrungsentzug zurückgeführt werden. Möglicherweise erfolgt auch eine Filmbildung des Siliconöls auf der Oberfläche der Mikroorganismen, die die Vitalität der Keime einschränkt, was in Kapitel 4.4.2.2 ausführlich diskutiert wird.

Bei den Formulierungen, die eine antimikrobielle Aktivität aufwiesen, konnte eine ausgeprägte antibakterielle, aber keine deutliche fungizide Wirkung beobachtet werden. Für die geplante orale Anwendung der Siliconölemulsionen bei CED ist die antibakterielle Wirkung von größerer Bedeutung als die antimykotische. Da diese antibakterielle Wirkung von der Zusammensetzung, speziell vom Emulgator der Emulsion abhängig war, wurde in weiteren Untersuchungen auch der Einfluss anderer Parameter (z.B. Viskosität des Siliconöls, Ölkonzentration) geprüft (siehe Kapitel 4.4.2).

4.4.2 Mikrobiologische Untersuchungen mit *E. coli* 2332

Bei Patienten, die an Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa leiden, konnte eine veränderte intestinale Darmflora mit einer Zunahme des Anteils an pathogenen Keimen (z.B. *Escherichia coli*, *Mycobakte-*

rium paratuberculosis) festgestellt werden (11,125,151-153). Da diese pathogenen Bakterien verstärkt am intestinalen Darmepithel adhären und die intestinale Barriere zerstören, tragen sie zur Förderung und Aufrechterhaltung der Entzündung im Darm bei.

In den Untersuchungen zur „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (Kapitel 4.4.1) konnte eine antibakterielle Wirkung von ausgewählten Siliconölemulsionen gezeigt werden. Um diese Wirkung in Hinblick auf die geplante orale Therapie der CED mit Siliconölemulsionen zu differenzieren und zu optimieren, wurden fortführende Studien durchgeführt.

Da für die CED in der Literatur ein vermehrtes Vorkommen von pathogenen *Escherichia coli*-Stämmen beschrieben wird (152,296,297), wurde für die weiteren Versuche das gramnegative Bakterium *E. coli* 2332 ausgewählt, welches eine hohe Adhärenz besitzt. *Escherichia coli* gehört zu der Familie der Enterobacteriaceae, die mit Hilfe von Fimbrien an der Darmwand adhären können (298). Sie können sowohl unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen wachsen und sind sehr widerstandsfähig gegen oberflächenaktive Substanzen. Da *E. coli* zu den gramnegativen Bakterien zählen, besitzen sie eine äußere Membran mit Lipopolysacchariden. Das Lipid A dieser Lipopolysaccharide wird nach der Zerstörung des Bakteriums freigesetzt und wirkt als Endotoxin. Bei den CED-Patienten konnte nicht nur ein vermehrtes Vorkommen von *E. coli* im Darm, sondern auch eine erhöhte Endotoxin-Konzentration im Blut beobachtet werden (299). Könnte man nun die Keimdichte der pathogenen *E. coli*-Stämme im Darm reduzieren, würde wahrscheinlich auch die Endotoxin-Konzentration im Blut sinken und somit die Schwere des Krankheitsverlaufes abgeschwächt werden.

Aus diesem Grund wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die antibakterielle Wirkung von Siliconölemulsionen hinsichtlich *E. coli* 2332 geprüft. Die Keimzahl in den Proben wurde nach 1 und 7 Tagen bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei 37°C, da dies der menschlichen Körpertemperatur entspricht. Die Ergebnisse dieser ausführlichen Untersuchungen werden im Folgenden vorgestellt.

4.4.2.1 Einfluss von pH-Wert und Osmolalität der äußeren Phase der Emulsion

Die in Kapitel 4.4.1 untersuchten Emulsionen waren weder isotonisiert noch isohydrisch (keine Einstellung des pH-Wertes). Es sollte nun ausgeschlossen werden, dass der beobachtete antibakterielle Effekt der Poloxamer 188- und Cremophor® EL-stabilisierten Emulsionen durch einen nicht physiologischen pH-Wert bzw. eine unzureichende Isotonie der Proben bedingt war. Um dies zu prüfen wurden Siliconölemulsionen (35 % M500, 2 % Poloxamer 188) mit unterschiedlichen äußeren Phasen unter Standardbedingungen hergestellt, so dass sie verschiedene pH-Werte und Osmolalitäten aufwiesen. Als äußere Phasen wurden die in Tab. 4-15 dargestellten Variationen (P1-P5) eingesetzt. Die Teilchengrößenverteilung der Emulsionen sind vergleichbar (Median-Werte (nA): 0,78-0,95 µm). Es erfolgte jedoch nicht nur die Untersuchung der M500-Emulsionen, sondern es wurden auch die reinen äußeren Phasen sowie die entsprechenden Emulgatorlösungen (2 % Poloxamer 188 gelöst in den verschiedenen äußeren Phasen) in die Studie einbezogen.

Tab. 4-15: Darstellung der Zusammensetzung der untersuchten äußeren Phasen (P1-P5) sowie deren Osmolalität (–: Osmolalität < 250 mOsmol/kg; +: Osmolalität 250-310 mOsmol/kg (isoton)). Weiterhin werden die pH-Werte der reinen äußeren Phasen sowie der Emulsionen und Emulgatorlösungen, die mit der entsprechenden äußeren Phase hergestellt wurden, aufgeführt. Die pH-Werte und Osmolalitäten wurden nach dem Autoklavieren der Proben bestimmt.

	Zusammensetzung der äußeren Phase	Osmolalität	pH-Wert		
			äußere Phase	Emulsion	Emulgator-Lsg.
P1	Wasser	—	6,7	3,5	5,5
P2	2,05 % Glycerol in Wasser	+	4,0	3,4	3,8
P3	10 mM Phosphatpuffer pH 7,4	—	7,4	6,9	7,3
P4	2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4	+	7,4	6,9	7,3
P5	150 mM PBS pH 7,4 (mit NaCl/KCl)	+	7,4	7,2	7,4

In Abb. 4-34 ist zu erkennen, dass bei den Emulsionen, die mit Wasser (P1), 10 mM Phosphatpuffer (P3) bzw. 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer (P4) als äußere Phase hergestellt wurden, bereits nach 24 h eine vollständige Keimzahlreduktion auftrat. Die entsprechenden Emulgatorlösungen bzw. reinen äußeren Phasen zeigten dagegen eine geringe Zunahme der *E. coli*-Konzentration 24 h nach Inokulation.

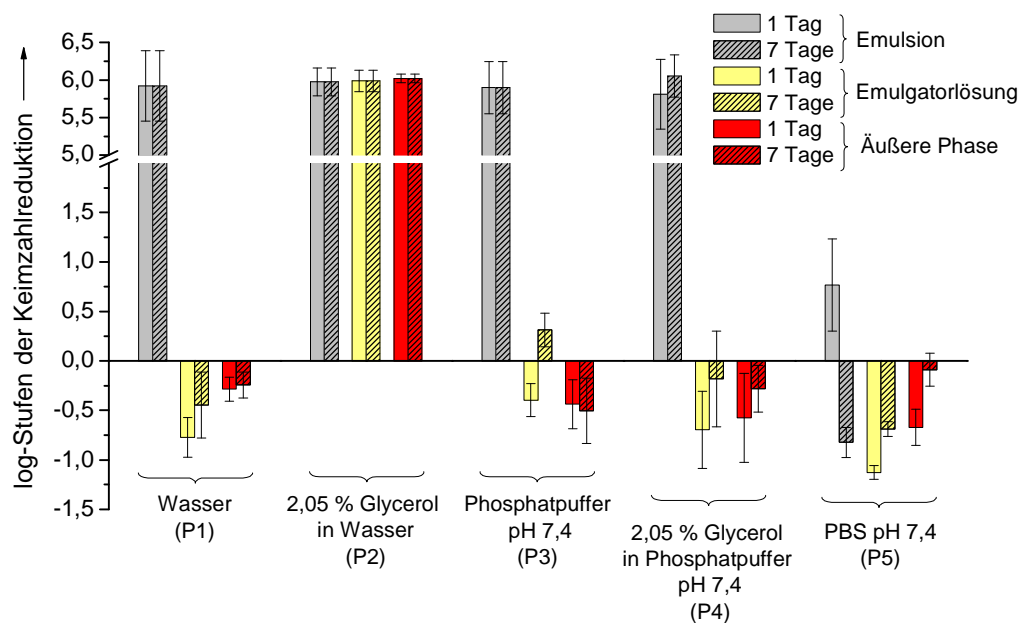


Abb. 4-34: Einfluss der Zusammensetzung der äußeren Phase auf die antibakterielle Wirkung der Emulsionen. Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion von *E. coli* 2332 in den untersuchten Proben nach 1 und 7 Tagen (n=3-4); Untersuchung von Emulsion (M500 35 %, Poloxamer 188 2 %, äußere Phase ad 100 %), Emulgatorlösung (2 % Poloxamer 188 gelöst in der äußeren Phase) sowie der reinen äußeren Phase; eine vollständige Keimabtötung in den Proben tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 5,8-6,0 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben)

Der antibakterielle Effekt der gepufferten Siliconölemulsion wird jedoch deutlich reduziert, wenn statt Glycerol zur Isotonisierung NaCl und KCl (P5) eingesetzt wird. So wies die Emulsion, die mit 150 mM PBS (P5) formuliert wurde, nach 24 h eine geringe Abnahme der Keimzahl auf, nach 7 Tagen war aber wieder eine Zunahme der Keimzahl zu beobachten. Die erhöhte Ionenkonzentration in der äußeren Phase scheint somit die antibakterielle Aktivität der untersuchten Siliconölemulsion negativ zu beeinflussen. Alle Proben, die mit 2,05 % Glycerol in der äußeren Phase, jedoch ohne Puffersystem (P2), hergestellt wurden, zeigten bereits nach 24 h eine vollständige Keimzahlreduktion. Da die Proben mit 2,05 % Glycerol isoton sind, könnte die mögliche Ursache für die antibakterielle Wirkung der nicht angepasste pH-Wert sein. Diese Vermutung wird verstärkt, da reines Wasser und auch die mit Wasser hergestellte Emulgatorlösung (pH 5,5) nur einen schwach sauren pH-Wert, aber eine deutlich unzureichende Osmolalität aufwiesen und trotzdem eine Zunahme der *E. coli*-Konzentration beobachtet werden konnte. Der pH-Wert der Proben, deren Herstellung mit 2,05 % Glycerol in Wasser (P2) als äußere Phase erfolgte, lag nach der Autoklavierung zwischen 3 und 4. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die antibakterielle Aktivität der Proben besser einordnen zu können, wurde die Vitalität von *E. coli* 2332 in verschiedenen 10 mM Phosphatpuffern (pH 3,0-7,4; keine Isotonisierung) untersucht (siehe Abb. 4-35). Erst ab einem pH-Wert < 4,0 war eine Abnahme der Keimzahl 1 und 7 Tage nach Versuchsstart zu beobachten. Bei einem pH-Wert von 3,0 trat bereits nach 24 h eine vollständige Keimzahlreduktion auf.

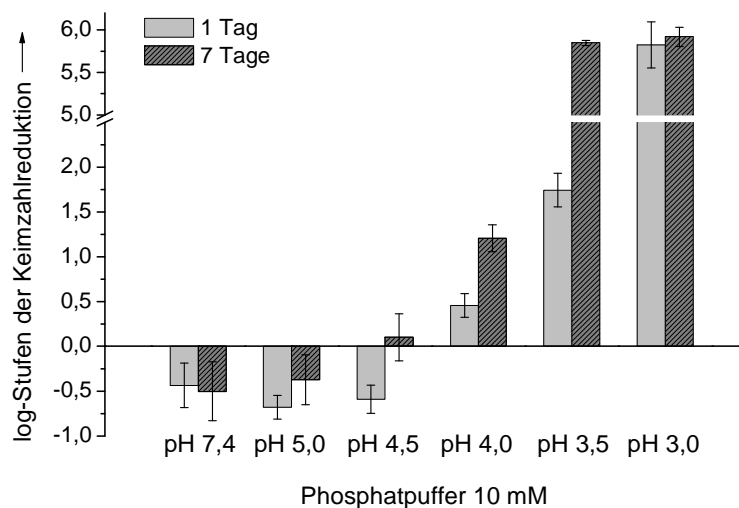


Abb. 4-35: Darstellung des Einflusses des pH-Wertes verschiedener 10 mM Phosphatpuffer auf die log-Keimzahlreduktion von *E. coli* 2332 1 und 7 Tage nach Inokulation (n=3-4); eine vollständige Keimabtötung in den Proben tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 5,8-5,9 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben)

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der deutliche antibakterielle Effekt in allen Glycerol/Wasser-Proben (P2) auf den niedrigen pH-Wert nach der Autoklavierung zurückgeführt werden kann. Eine mögliche antimikrobielle Wirkung bedingt durch das Glycerol tritt erst bei höheren Glycerol-Konzentrationen auf (300).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass ein zu saurer pH-Wert von Emulsionen und Lösungen die Vitalität von *E. coli* 2332 vermindert, eine unzureichende Isotonie dagegen keine Auswirkungen hat. Der bei der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (Kapitel 4.4.1) beobachtete

antibakterielle Effekt der Poloxamer 188-stabilisierten Siliconölemulsion konnte für *E. coli* 2332 auch für eine entsprechende isotonische und isohydriche Emulsion bestätigt werden.

Da sich die äußere Phase P4 (2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer) aufgrund einer ansprechenden Isotonie und Isohydrie als sehr geeignet erwies wurden im Folgenden alle untersuchten Emulsionen mit der äußeren Phase P4 formuliert. Die reine äußere Phase sowie die entsprechende Emulgatorlösung zeigten im Gegensatz zu der mit 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 als äußere Phase formulierten Emulsion keinen antibakteriellen Effekt.

Ausgehend von den hier gewonnen Erkenntnissen wurden ausgewählte Emulsionen, die bei der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (siehe Kapitel 4.4.1) eine antibakterielle Wirkung zeigten, sowie die entsprechenden Emulgatorlösungen erneut hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität gegenüber *S. aureus* und *P. aeruginosa* beurteilt. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten antibakteriellen Effekte nicht nur durch die unzureichende Isotonisierung und den zu geringen pH-Wert bedingt waren. Aus diesem Grund wurden die Emulsionen und Lösungen mit der äußeren Phase P4 (2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4) hergestellt. Es erfolgte die erneute Untersuchung der M500-Emulsionen, die mit Cremophor® EL bzw. Poloxamer 188 stabilisiert wurden, sowie der Poloxamer 188-stabilisierten Sojaölemulsion (35 % Ölkomponente, 2 % Emulgator). Außerdem wurden die 2%igen Emulgatorlösungen von Cremophor® EL und Poloxamer 188 hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität geprüft.

Die Ergebnisse der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (siehe Kapitel 4.4.1.1) konnten für *P. aeruginosa* nur für die Poloxamer 188-stabilisierte M500-Emulsion sowie für die entsprechende Emulgatorlösung bestätigt werden (siehe Anhang A4, Abb. A4-1). Die Emulsion zeigte bereits 24 h nach Inokulation eine vollständige Keimzahlreduktion, die Poloxamer 188-Lösung wies keine antibakterielle Aktivität auf. Für die Cremophor® EL-stabilisierte Emulsion und die Sojaölemulsion konnten dagegen nach 7 Tagen keine antibakterielle Wirksamkeit mehr festgestellt werden. Vermutlich war die beobachtete ausgeprägte antibakterielle Aktivität dieser Emulsionen bei der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ durch einen zu geringen pH-Wert der Proben bedingt, da *P. aeruginosa* wie *E. coli* 2332 eine verminderte Vitalität im sauren pH-Bereich zeigte (Anhang A4, Abb. A4-1). Auch die 2%ige Cremophor® EL-Lösung besaß keine bakterizide Wirkung.

Dagegen wiesen alle mit *S. aureus* beimpften Proben 7 Tage nach Inokulation trotz ansprechender Isotonie und Isohydrie eine vollständige Keimzahlreduktion auf (siehe Anhang A4, Abb. A4-2). Bei der Poloxamer 188-stabilisierten M500-Emulsion konnte jedoch bereits nach 24 h kein lebender Keim mehr nachgewiesen werden. Auffallend bei den Untersuchungen mit *S. aureus* war, dass auch die 2%igen Emulgatorlösungen, trotz Isotonisierung und pH-Wert-Einstellung, gegenüber *S. aureus* eine antibakterielle Aktivität aufwiesen. Somit kann der antibakterielle Effekt für das Bakterium *S. aureus* nicht ausschließlich der Emulsion zugeordnet werden.

Wie schon bei der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (Kapitel 4.4.1.1) konnte eine höhere Empfindlichkeit des grampositiven Bakteriums *S. aureus* im Vergleich zu dem gramnegativen

Bakterium *P. aeruginosa* beobachtet werden (eventuell durch den unterschiedlichen Aufbau der Zellwand begründet → siehe Kapitel 4.4.1.1). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein zu geringer pH-Wert die Vitalität der Keime negativ beeinflusst.

Die ergänzenden Untersuchungen mit *P. aeruginosa* zeigten, dass der antibakterielle Effekt der O/W-Emulsionen vermutlich von der dispergierten Ölphase und der Wahl des Emulgators abhängig ist. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurden Untersuchungen zum Einfluss dieser Parameter auf die Vitalität von *E. coli* 2332 durchgeführt.

4.4.2.2 Einfluss des Emulgators und der Ölkomponente

Um den Einfluss des Emulgators auf die antibakterielle Aktivität der Siliconölemulsionen zu beurteilen, erfolgte die Herstellung von M500-Siliconölemulsionen (35 % M500) mit sieben verschiedenen Emulgatoren (2 %; Ausnahme: HPMC 90SH-100 0,5 %) unter Standardbedingungen. Diese Emulsionen waren im Gegensatz zu den bei der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ untersuchten Proben isotoniert und ihr pH-Wert lag zwischen pH 6,9 und pH 7,4 (äußere Phase P4: 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 ad 100 %). Die Median-Werte der Emulsionen sind in der Tabelle A5-1 im Anhang A5 aufgeführt. Außerdem wurde zum Vergleich die antibakterielle Aktivität der reinen Emulgatorlösungen (Emulgator gelöst in der äußeren Phase P4) geprüft, um einen Effekt der reinen oberflächenaktiven Substanzen auszuschließen.

Die logarithmische Keimzahlreduktion von *E. coli* 2332 in den M500-Emulsionen sowie den entsprechenden Emulgatorlösungen, 1 und 7 Tage nach Inokulation, ist in Abb. 4-36 dargestellt.

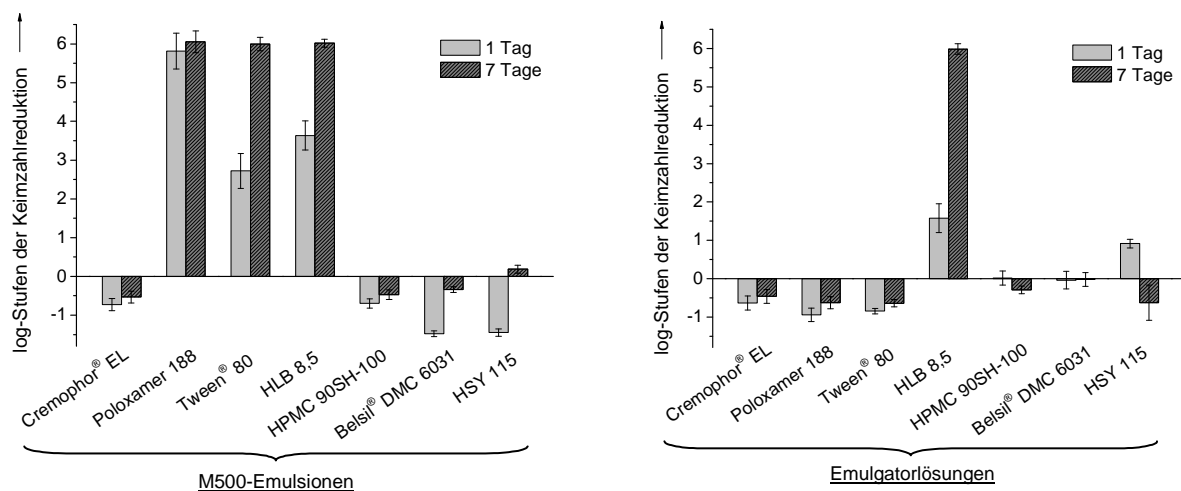


Abb. 4-36: Einfluss des zur Herstellung eingesetzten Emulgators auf die antibakterielle Wirkung der Siliconölemulsionen. Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion von *E. coli* 2332 in den untersuchten Proben nach 1 und 7 Tagen (n=3-4); *links:* Untersuchung von Siliconölemulsionen (M500 35 %; Emulgator 2 % bzw. 0,5 %; 2,05 % Glycerol in Phosphatpuffer pH 7,4 ad 100 %); *rechts:* Untersuchung von Emulgatorlösungen (2 % bzw. 0,5 % Emulgator gelöst in 2,05 % Glycerol in Phosphatpuffer pH 7,4); eine vollständige Keimabtötung in den Proben tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 6,0 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben)

Nur drei der sieben untersuchten Siliconölemulsionen zeigten eine antibakterielle Aktivität (Abb. 4-36, *links*). In den Poloxamer 188-, Tween® 80- und HLB 8,5-stabilisierten Emulsionen waren nach 7 Tagen keine lebenden *E. coli*-Keime mehr nachweisbar. Für die Cremophor® EL-stabilisierte M500-Emulsion konnte wie bereits bei den ergänzenden Untersuchungen mit *P. aeruginosa* (siehe Kapitel 4.4.2.1) kein antibakterieller Effekt beobachtet werden. Auch bei den Emulsionen mit den beiden Silicontensiden Belsil® DMC 6031 und HSY 115 sowie bei der HPMC-stabilisierten Emulsion wurde keine antibakterielle Aktivität festgestellt. Die Silicontensid-Formulierungen wurden aufgrund von Stabilitätsproblemen nach der Herstellung nicht autoklaviert, aber hinsichtlich einer mikrobiologischen Kontamination vor Versuchsstart geprüft. Dabei konnten keine lebenden Keime nachgewiesen werden.

Betrachtet man die antibakterielle Wirkung der verschiedenen reinen Emulgatorlösungen (Abb. 4-36, *rechts*), so trat nur bei der HLB 8,5-Lösung (2 %) eine Keimzahlreduktion auf. Alle anderen Lösungen zeigten eine unveränderte bzw. eine geringe Zunahme der *E. coli*-Konzentration 7 Tage nach Versuchsstart. Somit kann die antibakterielle Aktivität der M500-Emulsion, die mit dem Emulgatorgemisch von Span® 80 und Tween® 80 (HLB 8,5) stabilisiert wurde, nicht eindeutig dem dispergierten Siliconöl zugeordnet werden. Da die Lösung des Emulgators Tween® 80 keine antibakteriellen Eigenschaften aufweist, ist vermutlich das Span® 80 in der HLB 8,5-Lösung für die negative Beeinflussung der Vitalität von *E. coli* 2332 verantwortlich.

Den erzielten Ergebnissen zufolge weisen nur die Poloxamer 188- und Tween® 80-stabilisierten M500-Emulsionen einen eindeutigen antibakteriellen Effekt gegenüber *E. coli* 2332 auf. Die entsprechenden Emulgatorlösungen zeigten keine Wirkung, so dass die Kombination von Emulgator und Siliconöl, also die Formulierung zur O/W-Emulsion, essentiell scheint für die antibakterielle Wirksamkeit. Als besonders geeignet zur Stabilisierung der Emulsion scheint Poloxamer 188, da bei der entsprechenden Probe bereits nach 24 h nahezu kein lebender *E. coli*-Keim mehr nachweisbar war.

Die Ergebnisse zur antibakteriellen Wirksamkeit bestimmter Emulsionsformulierungen werfen die Frage nach dem zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus auf. In der Literatur wurde eine antibakterielle Aktivität von so genannten Surfactant Lipid Preparations (SLP) beschrieben (301,302). Diese Formulierungen (Nanoemulsionen oder Liposomen) bestehen aus einer Lipidkomponente (z.B. Sojaöl) sowie verschiedenen Emulgatoren (z.B. Tween® 60, Triton® X-100) und weisen ohne Zusatz von Antibiotika eine antibakterielle Wirkung gegen bestimmte Bakterienspezies (z.B. *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*) auf. In elektronenmikroskopischen Studien konnten Hamouda und Baker beobachten, dass die von ihnen untersuchte Emulsion die Bakterienzellwand zerstört und folglich eine Lyse des Bakteriums auftritt (302). Die Liposomen dagegen schädigen durch Fusion und Internalisierung das Bakterium, wobei keine unmittelbare Zelllyse nachweisbar war.

Für verschiedene Poloxamere wurden bereits zahlreiche Untersuchungen zur Interaktion mit Phospholipid-Schichten durchgeführt (303,304). Es konnte gezeigt werden, dass Poloxamere mit Zellmembra-

nen interagieren und so beispielsweise die Empfindlichkeit von Krebszellen mit einer Multiple-Drug-Resistance gegenüber antineoplastischen Chemotherapeutika erhöhen können (305).

Die antibakterielle Wirkung der Poloxamer 188-stabilisierten Siliconölemulsion könnte somit auf einer Interaktion der Polyoxyethylen-Ketten des Emulgators mit der Bakterienzellwand beruhen (Struktur Poloxamer 188 siehe Abb. 4-37). Poloxamer 188 adsorbiert mit dem Polyoxypropylen-Anteil am Siliconöltröpfchen, so dass die Polyoxyethylen-Ketten nach außen (in die wässrige Phase) ragen (306) und folglich mit der Zellmembran von *E. coli* 2332 wechselwirken können. Der antibakterielle Effekt war weiterhin bei der Tween® 80-stabilisierten M500-Emulsion zu beobachten (Abb. 4-36, links). Auch Tween® 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat; Struktur siehe Abb. 4-37) enthält endständige PEG-Ketten, die mit dem Bakterium in Wechselwirkung treten könnten. Auffallend war, dass, wie bereits erwähnt wurde, erst durch die Formulierung als O/W-Emulsion eine antibakterielle Wirkung der Proben gegenüber *E. coli* 2332 auftrat. Die reinen Poloxamer 188- bzw. Tween® 80-Lösungen zeigten keinen Effekt. Möglicherweise haben die Emulgatormoleküle in der Emulsionsformulierung eine „Mittlerfunktion“. Durch die Interaktion von Emulgator und Bakterium kommt der Kontakt mit dem Siliconöltröpfchen zu stande, der schließlich zur Bildung eines Siliconölfilms an der Bakteriumoberfläche führen kann.

Die weiteren untersuchten Emulgatoren wie Cremophor® EL (Struktur siehe Abb. 4-37) und Wacker Belsil® DMC 6031 (Struktur siehe Kapitel 3.1.2, Abb. 2-1) bzw. HSY 115, deren Siliconölemulsionen keine antibakterielle Aktivität aufwiesen, enthalten auch Polyoxyethyleinheiten. Diese sind jedoch mit Rizinolsäure bzw. Polyoxypropyleneinheiten gekoppelt und können somit nicht frei interagieren (keine endständigen PEG-Ketten).

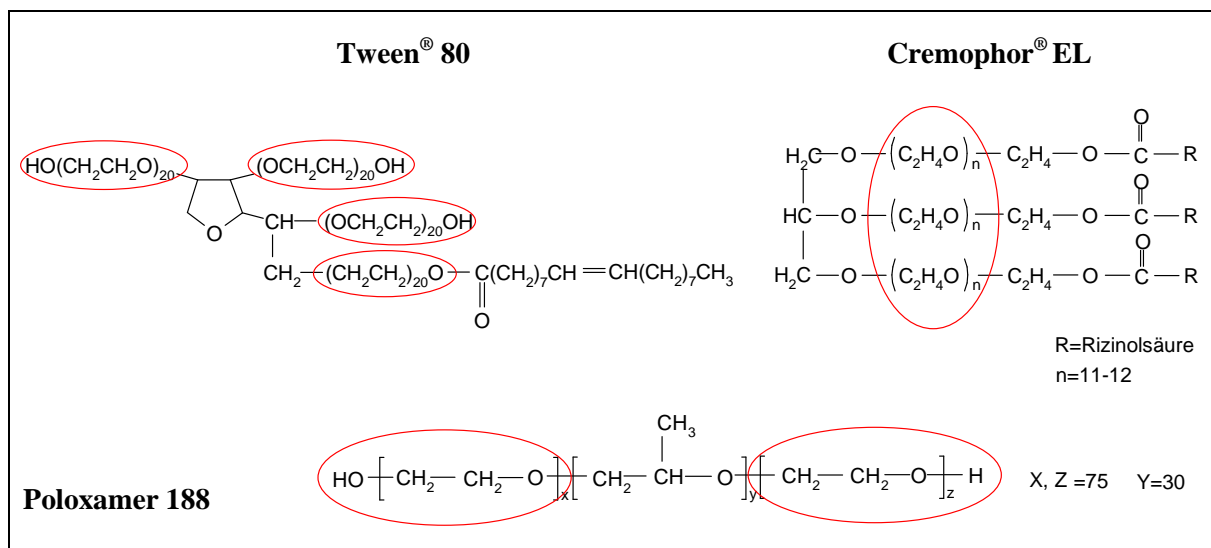


Abb. 4-37: Strukturformeln ausgewählter Emulgatoren; rot eingerahmt → Polyoxyethyleinheiten der Emulgatoren

Um die Vermutung der Filmbildung des Siliconöls auf der Oberfläche des Bakteriums weiter zu bekräftigen, wurden von Herrn Dorian Glöer (AG Pharmakologische Hämostaseologie, Universitäts-

linikum Jena) Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie^d durchgeführt. Durch den Zusatz von *E. coli* 2332 zu einer Poloxamer 188-stabilisierten 35%igen M500-Emulsion (äußere Phase (P4): 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4; D50-Wert: 0,69 µm (nA)) sollten mögliche morphologisch sichtbare Veränderungen der Bakterien aufgezeigt werden. Die Inokulation und Lagerung der Proben erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise wie bei der Durchführung der oben beschriebenen Versuche (siehe auch Kapitel 3.4.2.2). Es wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unbehandelten Bakterien im flüssigen Nährmedium sowie 24 h und 7 Tage nach Zusatz der Bakterien zur M500-Siliconölemulsion erstellt (siehe Abb. 4-38).

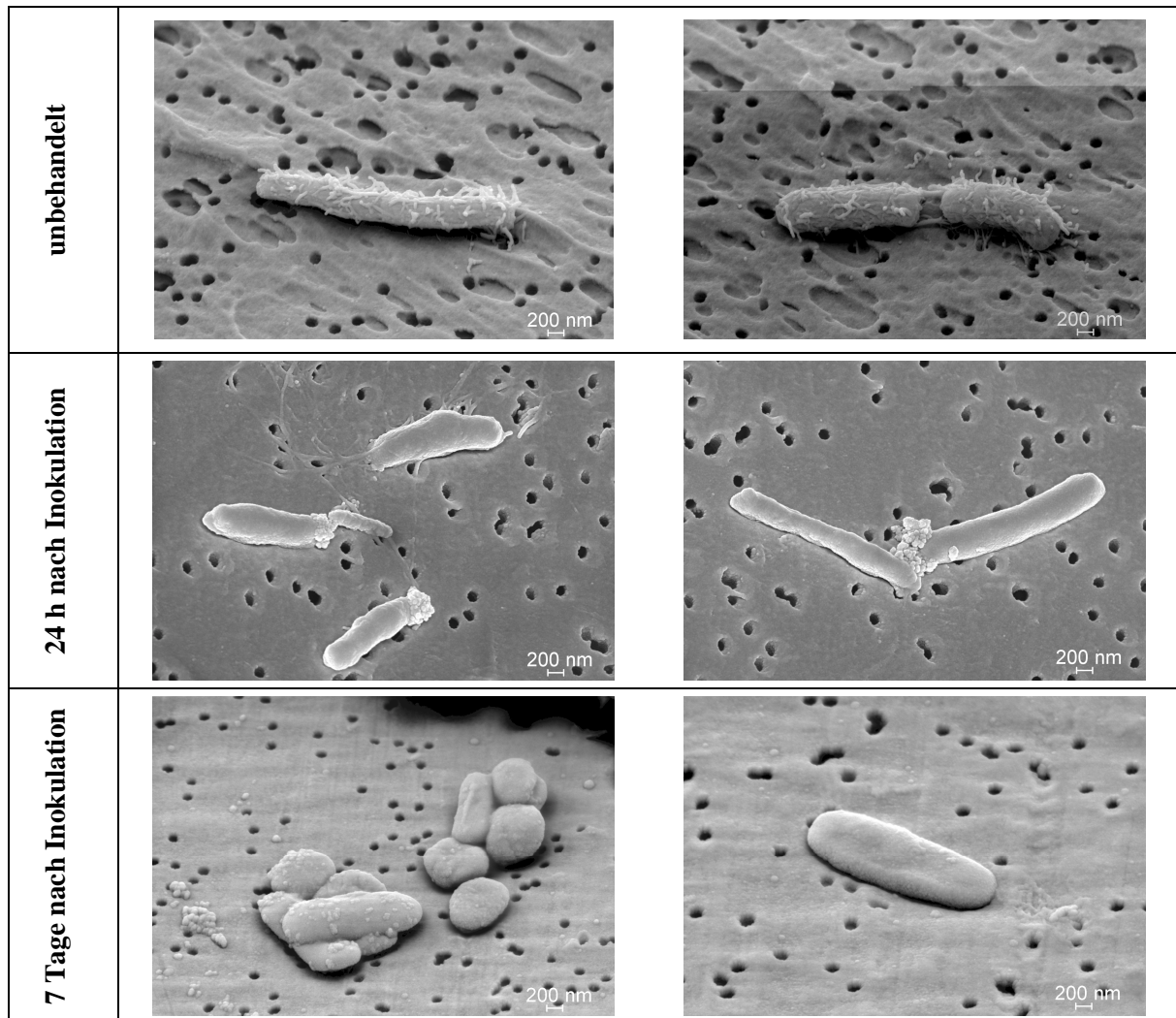


Abb. 4-38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *E.coli* 2332. *Oben:* unbehandelte *E. coli* 2332 in flüssigem Nährmedium; *Mitte* und *unten:* *E. coli* 2332 24 h bzw. 7 d nach Zusatz zur Siliconölemulsion (M500 35 %; Poloxamer 188 2 %; 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 ad 100 %)

^d Vorgehensweise: 1 ml Probe + 50 ml PBS wurden mittels Glasfritte filtriert (Filter: Nuclepore PC Membrane 25 mm; 0,2 µm; Whatman GmbH, D-Dassel); anschließend Fixierung der Probe auf dem Filter mittels 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2; Überführung des Filters in die alkoholische Reihe (10 %, 30 %, 50 %, 70 % Ethanol); Fortsetzung der alkohol. Reihe (80 % und 100 % Ethanol) im Elektronenmikroskopischen Zentrum, Universitätsklinikum Jena; kritische Trocknung des Filters und anschließende Bedampfung mit Gold; Untersuchung des präparierten Filters mittels Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (LEO 1530 Gemini FESEM; Carl Zeiss AG, D-Oberkochen)

Bei den unbehandelten *E. coli*-Keimen (Abb. 4-38, oben) sind auf der Oberfläche noch deutlich Fimbrien zu erkennen, die für die Adhäsion der Bakterien an der Zellwand eine Rolle spielen. Dagegen zeigten die Bakterien, die der Siliconölemulsion zugesetzt wurden, bereits nach 24 h eine glatte Oberfläche ohne sichtbare Fimbrien. 7 Tage nach der Inokulation der Proben weisen die *E. coli* außerdem eine abgeflachte Form auf.

Diese Beobachtungen bekräftigen die Vermutung, dass sich ein Siliconölfilm auf der Oberfläche des Bakteriums bildet, was durch die Interaktion der Emulgatormoleküle der Grenzfläche mit dem Bakterium ermöglicht wird. Dieser Siliconölfilm könnte die Ursache für die glatte Oberfläche (keine erkennbaren Fimbrien) der *E. coli*-Keime nach Zusatz zur Siliconölemulsion sein.

Von Interesse war außerdem, ob der antibakterielle Effekt der Emulsionen nur vom eingesetzten Emulgator oder aber auch vom Typ der dispergierten Ölphase abhängig ist. Um dies zu prüfen, wurden drei verschiedenen viskose Siliconöle (M10, M500 und M5000) sowie drei weitere pharmazeutische Öle (Miglyol® 812, Paraffinum perliquidum und Sojaöl) mit einem Masseanteil von 35 % und 2 % Poloxamer 188 als O/W-Emulsionen unter Standardbedingungen formuliert. Die Emulsionen waren isoton und isohydrisch (äußere Phase (P4): 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4). Die Median-Werte der Emulsionen sind im Anhang A5 (Tab. A5-1) tabellarisch dargestellt.

In Abb. 4-39 ist deutlich sichtbar, dass die Emulsionen mit dem niedrig viskosen Siliconöl M10 sowie den anderen drei pharmazeutischen Ölen, 1 bzw. 7 Tage nach Inokulation, keine deutliche Keimzahlreduktion von *E. coli* 2332 aufweisen. Eine eindeutige antibakterielle Wirkung war dagegen bei den Formulierungen mit den Siliconölen M500 und M5000 zu beobachten, in denen nach 7 Tagen kein lebendes Bakterium mehr identifiziert werden konnte.

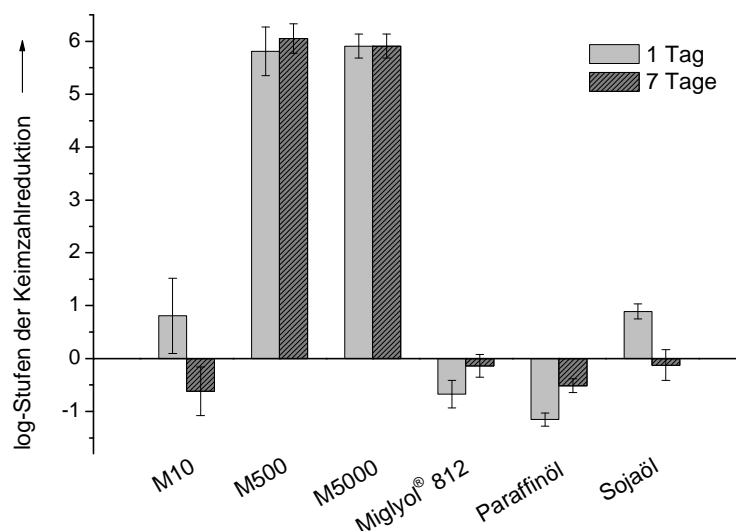


Abb. 4-39: Einfluss der zur Herstellung eingesetzten Ölkomponente auf die antibakterielle Wirkung der Emulsionen. Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion von *E. coli* 2332 in den untersuchten Proben 1 und 7 Tage nach Inokulation (n=3-4); (Zusammensetzung der Emulsionen: Ölkomponente 35 %; Poloxamer 188 2 %; 2,05 % Glycerol in Phosphatpuffer pH 7,4 ad 100 %); eine vollständige Keimabtötung in den Proben tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 5,9-6,0 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben)

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass nur in den Emulsionen mit höher viskosen Siliconölen eine antibakterielle Wirksamkeit auftritt. Folglich wird die Vermutung bekräftigt, dass der antibakterielle Effekt bestimmter Siliconölemulsionen durch die Bildung eines Siliconölfilms an der Bakterienoberfläche bedingt sein könnte. Die geringe antibakterielle Aktivität der M10-Emulsion nach 24 h könnte auf die geringere Viskosität des Siliconöls M10 zurückgeführt werden. Die M10-Tröpfchen weisen eine höhere Beweglichkeit auf, so dass möglicherweise die Interaktion zwischen Bakterium und Siliconöltröpfchen erschwert wird.

Somit konnte für *E. coli* 2332 gezeigt werden, dass sowohl der Emulgator als auch der Öltyp die antibakterielle Wirkung der O/W-Emulsion beeinflusst. Außerdem wurde beobachtet, dass sich die beiden gramnegativen Bakterien *E. coli* 2332 und *P. aeruginosa* hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Poloxamer 188- und Cremophor® EL-stabilisierten Emulsionen im Gegensatz zu dem grampositiven Bakterium *S. aureus* sehr ähnlich verhalten.

4.4.2.3 Einfluss der Siliconölkonzentration sowie der Inokulationskonzentration

Als weiterer Parameter wurde der Einfluss der Siliconölkonzentration auf die antibakterielle Aktivität der Emulsion untersucht. In den Studien zum Ausbreitungs- und Benetzungsverhalten ausgewählter Siliconölemulsionen (Kapitel 4.3) konnte gezeigt werden, dass der oberflächenspannungsreduzierende Effekt bis zu einem Siliconölgehalt von 0,1 % erhalten bleibt. Um zu prüfen, ob auch die antibakterielle Aktivität bei einer so geringen Konzentration der dispersen Phase noch nachweisbar ist, wurde eine 35%ige M500-Emulsion, stabilisiert mit 2 % Poloxamer 188 (äußere Phase (P4): 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4), hergestellt und mit der reinen äußeren Phase auf verschiedene Siliconölgehalte (35 % - 0,1 %) eingestellt. Die Emulsionen waren stabil und wiesen nach der Verdünnung keine Zunahme der Partikelgröße (D50-Wert (nA): 0,78 µm) auf.

Eine vollständige Reduktion der Keimzahl nach 24 h trat nur bei den Proben mit einem Siliconölgehalt von 35 % und 30 % auf (Abb. 4-40, links). 7 Tage nach Inokulation war jedoch auch in der 25%igen M500-Probe kein lebender *E. coli*-Keim mehr nachweisbar. Eine weitere Verdünnung der Poloxamer 188-stabilisierten Emulsion führte zu einer weiteren Reduktion der antibakteriellen Aktivität (Siliconölgehalt \leq 20 %) der Proben nach einem Tag bzw. zu einer Zunahme der Keimzahl nach 7 Tagen. Bis zu einer Siliconölkonzentration von 10 % war nach 24 h noch ein schwacher antibakterieller Effekt zu beobachten. Außerdem wurde die Poloxamer 188-stabilisierte 35%ige M500-Emulsion auch mit einer 2%igen Poloxamer 188-Lösung verdünnt. Das Poloxamer 188 wurde in der äußeren Phase, die zur Formulierung der Emulsion eingesetzt wurde, gelöst und der Siliconölgehalt der Emulsion auf 10 % und 1 % eingestellt. In beiden Proben war nach 24 h eine geringe logarithmische Keimzahlreduktion (10%ige Emulsion: $0,99 \pm 0,14$; 1%ige Emulsion: $1,48 \pm 0,33$) zu beobachten, nach 7 Tagen trat jedoch wieder eine Zunahme der *E. coli*-Konzentration auf.

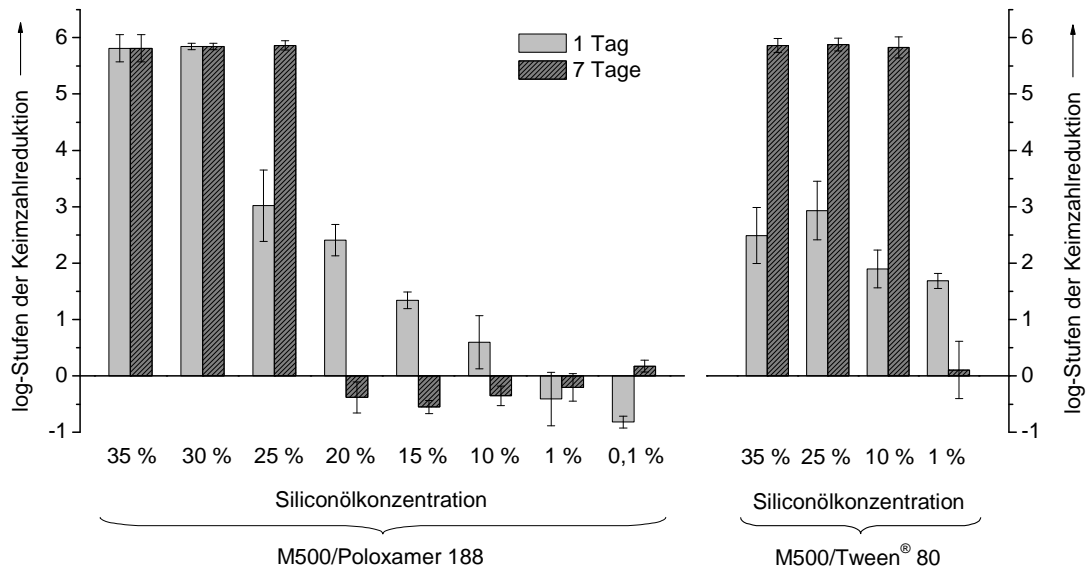


Abb. 4-40 Einfluss der Siliconölkonzentration der Emulsionen auf deren antibakterielle Wirkung. Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion von *E. coli* 2332 in den untersuchten Proben nach 1 und 7 Tagen (n=3-4); *links*: Verdünnung einer Poloxamer 188-stabilisierten M500-Emulsion; *rechts*: Verdünnung einer Tween® 80-stabilisierten M500-Emulsion (Zusammensetzung der Ausgangsemulsionen: M500 35 %; Emulgator 2 %; 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 ad 100 %; Verdünnungsmedium: 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4); eine vollständige Keimabtötung in den Proben tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 5,8-5,9 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben)

Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die geringe bzw. fehlende antibakterielle Aktivität der verdünnten Siliconölemulsionen ($M500 \leq 20 \%$) durch eine verminderte Poloxamer 188-Konzentration bedingt ist, sondern wirklich auf den niedrigeren Siliconölgehalt der Emulsionen zurückgeführt werden kann.

Da in den Untersuchungen zum Einfluss des Emulgators auf die antibakterielle Aktivität der Emulsion (Kapitel 4.4.2.2) nicht nur die Siliconölemulsion mit Poloxamer 188, sondern außerdem die mit Tween® 80 stabilisierte Zubereitung (D50-Wert (nA): $1,82 \mu\text{m}$) eine vollständige Reduktion der Keimzahl nach 7 Tagen aufwies, wurde auch hier der Einfluss der Siliconölkonzentration geprüft (Abb. 4-40, *rechts*). Im Rahmen dieser Studie wurden jedoch nur 4 verschiedene Siliconölkonzentrationen (35 %, 25 %, 10 %, 1 %) untersucht. Interessanterweise ist bei den Tween® 80-stabilisierten Emulsionen bis zu einem Siliconölgehalt von 10 % eine vollständige Keimzahlreduktion nach 7 Tagen zu beobachten. Erst bei einem Gehalt der dispersen Phase von nur 1 % war keine deutliche antibakterielle Aktivität der Probe nach 7 Tagen mehr nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Poloxamer 188-stabilisierte M500-Emulsion nur bis zu einem Siliconölgehalt von 25 % eine deutliche antibakterielle Aktivität aufweist, bei der Tween® 80-stabilisierten Emulsion bleibt der Effekt dagegen bis zu einer Ölkonzentration von 10 % erhalten. Trotz einer besseren antibakteriellen Wirkung der 35%igen Poloxamer 188-M500-Emulsion 24 h nach Inokulation im Vergleich zur Tween® 80-stabilisierten Emulsion ist diese jedoch auch bei geringeren Siliconölkonzentrationen wirksam.

Als weiterer Parameter wurde die Inokulationskonzentration variiert. Proben einer Poloxamer 188-stabilisierten M500-Emulsion (35 % M500; 2 % Poloxamer 188; 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 ad 100 %) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von *E. coli* 2332 (10^4 - 10^7 KBE/ml) zum Versuchsstart beimpft. In Abb. 4-41 ist zu erkennen, dass bei einer zu hohen Inokulationkonzentration (10^7 KBE/ml) kein antibakterieller Effekt der untersuchten Emulsion mehr beobachtet werden konnte. Bei allen weiteren Proben (*E. coli*-Konzentration 10^4 - 10^6 KBE/ml) trat 24 h (10^4 und 10^5 KBE/ml) bzw. 7 Tage (10^6 KBE/ml) nach Versuchsstart eine vollständige Keimzahlreduktion auf.

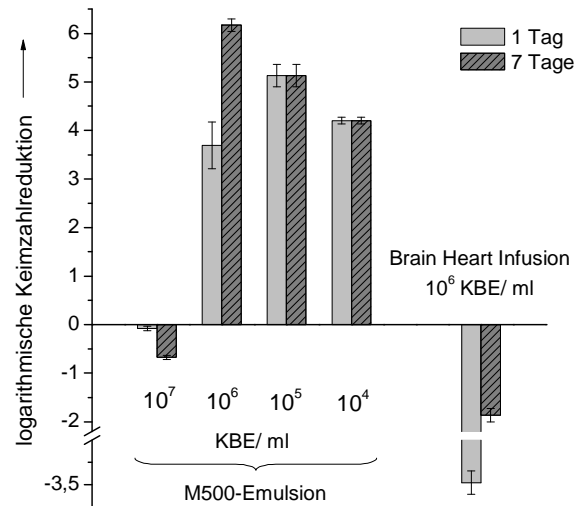


Abb. 4-41: Einfluss der Inokulationskonzentration von *E. coli* 2332 auf die antibakterielle Wirkung einer Poloxamer 188-stabilisierten M500-Emulsion. Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion von *E. coli* 2332 in den untersuchten Proben 1 und 7 Tage nach Inokulation (n=3-4); (Zusammensetzung der Emulsionen: M500 35 %; Poloxamer 188 2 %; 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 ad 100 %); vollständige Keimzahlreduktion entspricht abhängig von der Inokulationskonzentration 10^7 -ca. 7, 10^6 -ca. 6, 10^5 -ca. 5, 10^4 -ca. 4 log-Stufen

Aus den Ergebnissen der oben vorgestellten Studien mit den Poloxamer 188- und Tween® 80-stabilisierten M500-Emulsionen kann man schlussfolgern, dass ein bestimmtes Verhältnis von Siliconöltropfen zu Bakterien (*E. coli* 2332) für eine antimikrobielle Wirkung notwendig ist, welches nicht unterschritten werden darf. Es ist denkbar, dass für dieses Verhältnis die Anzahl der effektiven Kontakte von Siliconöltropfen und Bakterien mit anschließender Filmbildung an der Bakterienoberfläche von Bedeutung ist. Die Zahl der Öltröpfchen, die auf ein Bakterium treffen und auch spreiten, könnte von der Konzentration der Siliconöltropfen, deren Größe, deren Bewegungsgeschwindigkeit (abhängig von der Viskosität der äußeren Phase, der Masse der Tropfen und der Temperatur) und vom Emulgator (wichtig für die Grenzflächenwechselwirkung zwischen Öltröpfchen und Zellwand und damit für die Spreitungswahrscheinlichkeit pro Treffer) beeinflusst werden.

Aus der Dichte des Siliconöls ($0,97 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (47)) folgt, dass in 1 ml einer 35%igen M500-Emulsion ein Volumen von $0,36 \text{ cm}^3$ Siliconöl enthalten ist. Der Median der Teilchendurchmesser der Poloxamer 188-stabilisierten Emulsion betrug $0,78 \mu\text{m}$. Somit kann ein durchschnittliches Tropfenvolumen^e von $0,25 \mu\text{m}^3$ angenommen werden. Folglich^f sind in einem Milliliter der 35%igen Siliconölemulsion, die mit Poloxamer 188 stabilisiert wurde, etwa $1,44 \cdot 10^{12}$ Siliconöltropfen enthalten. In den Untersu-

^e Annahme: Tröpfchen in Kugelgestalt $\Rightarrow V = \frac{1}{6} \pi \cdot d^3$

^f Tropfenanzahl $n = V_{(\text{Siliconöl in 1 ml Emulsion})} / V_{(\text{Tropfen})}$

chungen zum Einfluss der Siliconölkonzentration wurden die Emulsionen jedoch nur mit einer Konzentration von ca. 10^6 KBE/ml angeimpft. Auch bei einer 20%igen Siliconölemulsion, in der nach 7 Tagen keine antibakterielle Wirkung mehr nachweisbar war, liegt immer noch ein deutlicher Überschuss (10^5 -fach) an Siliconöltröpfchen ($8,4 \cdot 10^{11}$ /ml) im Vergleich zur Bakterienanzahl vor. Für die antimikrobielle Wirkung der untersuchten Poloxamer 188-stabilisierten M500-Emulsion scheint somit eine deutlich größere Anzahl an Siliconöltröpfchen im Verhältnis zur Bakterienanzahl notwendig zu sein. Dies lässt vermuten, dass die Zahl der effektiven Kontakte zwischen Siliconöltröpfchen und Bakterium, die zu einer Spreitung der Siliconöltröpfchen auf der Bakterienoberfläche führen, klein ist. Demzufolge ist ein hoher Überschuss von Siliconöltröpfchen im Verhältnis zur Bakterienanzahl für eine antimikrobielle Wirkung erforderlich. Eine zu hohe Keimkonzentration bzw. eine zu geringe Konzentration der dispersen Phase führen folglich zum Verlust der antibakteriellen Aktivität der Siliconölemulsionen.

4.4.2.4 Einfluss der Partikelgröße

Außerdem war von Interesse, ob auch die Partikelgröße der Siliconölemulsionen einen Einfluss auf deren antibakterielle Aktivität besitzt. Um dies zu prüfen, erfolgte die Herstellung von drei Emulsionen mit gleicher Zusammensetzung (M500 35 %; Poloxamer 188 2 %; 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer ad 100 %) unter Variation der Herstellungsbedingungen (Tab. 4-16). Die Proben wurden nach dem Animpfen mit *E. coli* 2332 bei 37°C unter Schütteln gelagert, um so ein Aufräumen der großen Siliconölpartikel zu verhindern.

Die Emulsion E4, mit den kleinsten Partikeln, weist 24 h nach Inokulation eine etwas geringere antibakterielle Aktivität als die Emulsionen E5 und E6 auf (Abb. 4-42, *links*). Auffallend ist, dass die Emulsion E4 erst nach 7 Tagen eine vollständige Keimzahlreduktion zeigt, obwohl in den vorangegangenen Versuchen (z.B. Einfluss Emulgator- und Öltyp, Kapitel 4.4.2.2) in dieser Emulsion mit gleicher Zusammensetzung (Formulierung auch unter Anwendung der Standardprozessparameter) bereits nach 24 h kein lebender *E. coli*-Keim mehr nachweisbar war. Eine Ursache dafür ist möglicherweise das Schütteln während der Lagerung der Emulsion E4, das eventuell die Interaktion zwischen Siliconöltröpfchen und Bakterium erschwert.

Tab. 4-16: Herstellungsbedingungen und Partikelgrößen der drei untersuchten Emulsionen (siehe auch Abb. 4-42, *rechts*)

	Herstellungsbedingungen	Median [μm]	D99 [μm]
E4	<ul style="list-style-type: none"> · Voremulgierung mittels Ultra-Turrax® T8 · Hochdruckhomogenisation 10 Zyklen á 700 bar 	0,83	2,49
E5	<ul style="list-style-type: none"> · Voremulgierung mittels Ultra-Turrax® T8 · Hochdruckhomogenisation 2 Zyklen á 100 bar 	6,42	36,64
E6	<ul style="list-style-type: none"> · Emulgierung mittels Ultra-Turrax® T8 	24,52	112,0

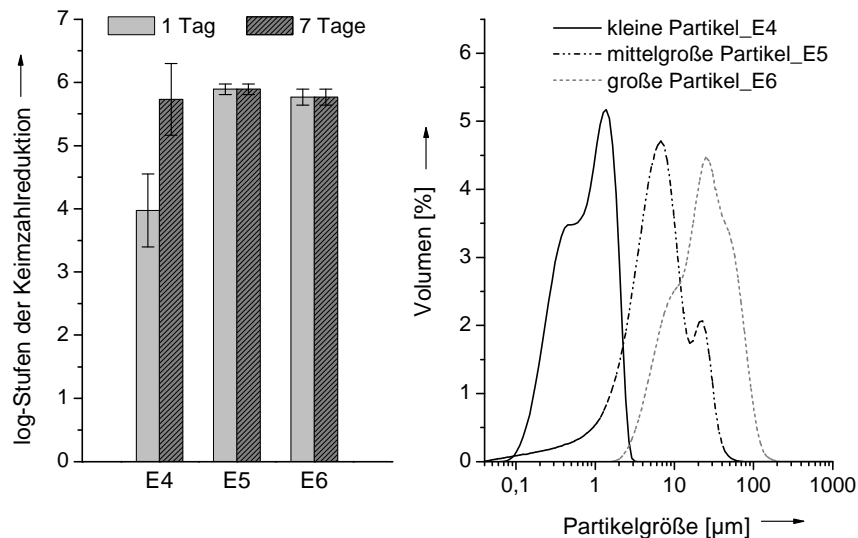


Abb. 4-42: Einfluss der Partikelgrößen der Siliconölemulsionen auf deren antibakterielle Wirkung; *links:* Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion von *E. coli* 2332 in den untersuchten M500-Emulsionen (M500 35 %; Poloxamer 188 2 %; 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 ad 100 %) 1 und 7 Tage nach Inokulation (n=3-4); eine vollständige Keimabtötung in den Proben tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 5,7-5,9 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben); *rechts:* Volumenbezogene Teilchengrößenverteilungen der Emulsionen E4, E5 und E6 (LD-PIDS-Messungen)

Eine Differenzierung zwischen den Emulsionen E5 und E6 ist nicht möglich. Dazu wären weitere Untersuchungen mit kürzeren Abständen zwischen der Bestimmung der Keimzahl in den Proben (z.B. alle 3 h) nötig.

Prinzipiell scheinen somit Emulsionen mit größeren Partikeln eine bessere antibakterielle Wirksamkeit zu besitzen, wenn diese unter Schütteln mit den Mikroorganismen inkubiert werden. Kritisch ist jedoch die Lagerstabilität solcher Emulsionen mit sehr großen Partikeln (insbesondere von E6) einzuschätzen, da diese schneller aufrahmen und koaleszieren und somit als Folge eine Phasentrennung der Emulsion auftritt.

Entsprechend der Modellrechnung aus Kapitel 4.4.2.3, weist die Emulsion E6 aufgrund ihrer Partikelgröße (siehe Tab. 4-16) deutlich weniger Siliconöltröpfchen (ca. $4,7 \cdot 10^7/\text{ml}$) auf als die Emulsion E4 (ca. $1,2 \cdot 10^{12}$ Siliconöltröpfchen pro Milliliter Emulsion). Daher ist bei Emulsion E6 eine geringere Anzahl an Kontakten zwischen Siliconöltröpfchen und Bakterium anzunehmen als bei Emulsion E4. Da jedoch für die Emulsion E4 eine etwas geringere antibakterielle Wirksamkeit als für die Emulsion E6 nachgewiesen werden konnte, kann man vermuten, dass die Anzahl der effektiven Kontakte, die zur Spreitung des Siliconöls auf der Bakterienoberfläche führen, bei der Emulsion E6 trotz der geringeren Anzahl an Tröpfchen pro Milliliter größer ist. Dies könnte auf einen vermutlich höheren Impuls der Partikel der Emulsion E6 (als Folge der größeren Masse) gegenüber den Partikeln der Emulsion E4 zurückgeführt werden.

4.4.2.5 Zusammenfassung

Die Untersuchungen mit *E. coli* 2332 zeigen, dass die antibakterielle Aktivität der Siliconölemulsionen durch verschiedene Parameter stark beeinflusst werden kann. So hat ein zu hoher Salzgehalt in der äußeren Phase der Emulsion eine negative Auswirkung auf die Keimzahlreduktion und ein zu geringer pH-Wert führt zum Absterben von *E. coli* 2332 (Kapitel 4.4.2.1). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Herstellung weiterer Proben 2,05 % Glycerol gelöst in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 als wässrige Phase verwendet, so dass eine ansprechende Isotonie und Isohydrie der Proben gewährleistet war. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die äußere Phase der Emulsionen einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Mikroorganismen hat.

Besonders von Bedeutung ist die Erkenntnis, dass nur die Siliconöle M500 und M5000, formuliert als O/W-Emulsion, und nicht auch die Emulsionen mit den anderen pharmazeutischen Ölen Miglyol® 812, Paraffin- bzw. Sojaöl, eine antibakterielle Wirkung gegenüber *E. coli* 2332 aufweisen (Kapitel 4.4.2.2). Interessanterweise konnte auch zwischen den verschiedenen viskosen Siliconölen differenziert werden. Bei der Emulsion mit dem niedrig viskosen Siliconöl M10 konnte keine antibakterielle Wirkung beobachtet werden, der Unterschied zwischen der M500- und M5000-Emulsion war dagegen minimal. Aus den Ergebnissen kann man somit schlussfolgern, dass Emulsionen mit höher viskosen Siliconölen eine bessere bakterizide Wirkung besitzen.

Als ein weiterer wichtiger Einflussparameter wurde der zur Herstellung der Emulsionen eingesetzte Emulgator identifiziert (Kapitel 4.4.2.2). So zeigten nur zwei von sieben O/W-Emulsionen, die mit verschiedenen Emulgatoren stabilisiert wurden, aber sonst identisch in ihrer Zusammensetzung waren, eine eindeutige antibakterielle Wirkung. Diese beiden Emulgatoren sind Poloxamer 188 und Tween® 80, deren reine 2%ige Lösungen keine antibakterielle Wirksamkeit aufwiesen.

Auch die Siliconöl- sowie die Inokulationskonzentration verändern die antibakteriellen Eigenschaften der Proben (Kapitel 4.4.2.3). Eine zu hohe Keimkonzentration bzw. eine zu geringe Konzentration der dispersen Phase führen zum Verlust der antibakteriellen Aktivität der Siliconölemulsionen.

Der geringste Einfluss konnte bei der Variation der Partikelgröße der Emulsionen beobachtet werden (Kapitel 4.4.2.4). Trotz deutlicher Unterschiede in den Teilchengrößenverteilungen der drei untersuchten Siliconölemulsionen war nur eine geringe Abstufung zwischen den Siliconölemulsionen hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität gegenüber *E. coli* 2332 möglich. Die Emulsion mit den kleinsten Partikeln wies eine etwas geringere Wirksamkeit auf.

Die Ergebnisse dieser ausführlichen Studien mit *E. coli* 2332, die eine starke Abhängigkeit der antibakteriellen Wirkung der Siliconölemulsionen von zahlreichen Parametern aufzeigen, waren insbesondere für die Formulierung von optimierten Siliconölemulsionen für die tierexperimentellen Untersuchungen von Bedeutung.

4.5 Tierexperimentelle Studien

In den mikrobiologischen Studien mit *E. coli* 2332 (Kapitel 4.4.2) konnte gezeigt werden, dass einige Siliconölemulsionen eine deutliche antibakterielle Aktivität besitzen. Außerdem weisen sie gute Ausbreitungs- und Filmbildungseigenschaften auf. Ob diese Siliconölemulsionen tatsächlich den Verlauf einer entzündlichen Darmerkrankung positiv beeinflussen können, wurde abschließend am Tiermodell untersucht. Es wurden verschiedene Erfolg versprechende Siliconölemulsionen ausgewählt, die zur Therapie einer Natrium-Dextransulfat (DSS)- bzw. 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-induzierten Colitis (siehe auch Kapitel 2.3.4) in C57BL/6-Mäusen (♀) eingesetzt wurden.

4.5.1 DSS-induzierte Colitis

Das Ziel der im Folgenden vorgestellten Untersuchungen war es, die Schwere des Verlaufes und die Letalität einer DSS-induzierten Colitis in C57BL/6-Mäusen durch die orale Gabe von Siliconölemulsionen abzuschwächen bzw. zu verringern (Versuchsdurchführung bzw. Versuchsgruppeneinteilung siehe Kapitel 3.5.2).

Die Induktion der Colitis erfolgte durch die Aufnahme von DSS mit dem Trinkwasser über einen Zeitraum von 6 Tagen. Im ersten Versuch wurden die Emulsionen und Lösungen zur Therapie der DSS-induzierten Colitis den Tieren über einen Magenschlauch (MSL) zugeführt bzw. mit dem Trinkwasser (enthält bereits DSS) ad libitum zur Verfügung gestellt. Zunächst erfolgte einerseits die Untersuchung der kommerziellen Emulsion Silfar® SE 4 (via MSL; 0,012 g Siliconöl/Applikation; Gruppe A1), um das therapeutische Potenzial einer kommerziell verfügbaren Formulierung beurteilen zu können. Andererseits wurde eine Poloxamer 188-stabilisierte M500-Emulsion mit dem DSS-haltigen Trinkwasser verdünnt (Gruppe B1). Ausgehend von einem täglichen Trinkvolumen einer gesunden Maus von ca. 5 ml (nicht überprüft; Literaturangabe (307,308)) würde die aufgenommene Siliconölmenge 0,175 g/Tag betragen. Es ist jedoch anzunehmen, dass mit zunehmender Schwere des Krankheitsverlaufes die Trinkmenge der Tiere abnimmt. Eine weitere Gruppe (E1) bekam täglich isotonische Kochsalzlösung via Magenschlauch anstelle einer Siliconölemulsion, um die eventuell auftretenden therapeutischen Effekte besser einordnen zu können. Der Gewichtsverlauf der Mäuse über den Versuchszeitraum von 14 Tagen ist in Abb. 4-43 dargestellt.

Mit Ausnahme der Gruppe F (Intaktkontrollgruppe; keine DSS-Gabe) kam es bei allen Tieren im Versuchsverlauf zu einer deutlichen Gewichtsreduktion. Die mit Silfar® SE 4 behandelten Tiere (Gruppe A1) zeigten dabei eine signifikant geringere Abnahme des Gewichtes als die Mäuse der Gruppen B1 und E1. Außerdem nahmen die Tiere der Gruppe A1 ab dem 11. Versuchstag wieder an Gewicht zu.

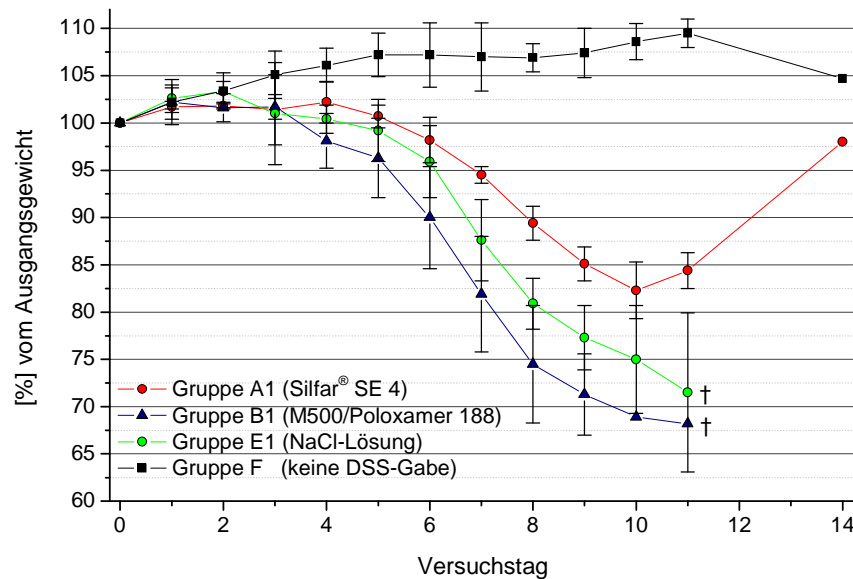


Abb. 4-43: Darstellung der Gewichtsverluste der Mäuse über den Versuchszeitraum von 14 Tagen; Zusatz von 2 % DSS zum Trinkwasser bzw. zur verdünnten Siliconölemulsion (Gruppe B1) bis zum 6. Versuchstag; Start der Therapie parallel zur DSS-Gabe; Applikation der Emulsionen und Lösung via Magenschlauch bzw. mit dem Trinkwasser

Während der ersten sechs Versuchstage konnte anhand der Füllhöhe der Trinkflaschen beobachtet werden, dass die Tiere der Gruppe B1 mehr Flüssigkeit und folglich mehr DSS aufnahmen. Dies war vermutlich, trotz der hohen Siliconölkonzentration, die Ursache für die stärkere Erkrankung und den ausgeprägten Gewichtsverlust der Mäuse der Gruppe B1. Das erhöhte Trinkvolumen könnte möglicherweise durch die Siliconölemulsion im Trinkwasser bedingt sein.

Alle Tiere der Gruppen A1, B1 und E1 zeigten im Versuchsverlauf eine eindeutige Verschlechterung des Allgemeinzustandes. Bei einzelnen Tieren traten rektale Blutungen und Diarrhö auf. Am Versuchstag 11 wurden alle noch lebenden Mäuse der Gruppen B1 und E1 aus ethischen Gründen mittels Ether getötet. Die Tiere wiesen eine sehr starke Gewichtsreduktion ($> 20\%$; siehe Abb. 4-43) sowie einen sehr schlechten Allgemeinzustand auf. Einige Tiere der Gruppen A1, B1 und E1 starben jedoch auch bereits im Versuchsverlauf an den Folgen der induzierten Colitis bzw. durch Verletzungen beim Einführen des Magenschlauches (siehe Tab. 4-17). Außerdem wurden je zwei Mäuse der Gruppe A1, obwohl diese einen deutlich besseren Allgemeinzustand besaßen, am Versuchstag 11 bzw. am Versuchstag 14 getötet, um deren Dickdarmlängen und Milzgewichte mit denen der Tiere in den Gruppen B1 und E1 vergleichen zu können.

Die Länge des Kolons ist ein Maß für die Stärke der Entzündung. Je länger der Dickdarm ist, desto weniger liegt eine entzündungsverursachte Verkürzung bzw. Ödembildung vor, d.h. je länger der Darm, desto weniger entzündet ist er. In der Literatur wurde nach DSS-Gabe bei den Tieren auch eine Vergrößerung der Milz infolge einer systemischen Entzündung beobachtet (309,310). Aus diesem Grund wurde das Milzgewicht als weiterer Parameter für den Gesundheitszustand der Mäuse ausgewählt.

Tab. 4-17: Anzahl der lebenden Versuchstiere in den verschiedenen Gruppen an den Versuchstagen 2, 8, 9, 10, 11 und 14; Aufführung der Todesursache in Klammern; MSL - Tod bei Magenschlauchgabe; Colitis - infolge der DSS-Applikation; Ether - Tötung der Tiere aus ethischen Gründen aufgrund eines sehr schlechten Allgemeinzustandes (AZ) bzw. zur Bestimmung der Dickdarmlänge und des Milzgewichtes (Gruppe A1, guter AZ)

Versuchstag	Gruppe A1 (DSS+Silfar® SE4) n=5	Gruppe B1 (DSS+Siliconölemulsion) n=5	Gruppe E1 (DSS+NaCl) n=4	Gruppe F (Kontrollgruppe) n=6
2	4/5 (MSL)	5/5	4/4	6/6
8	4/5	4/5 (Colitis)	4/4	6/6
9	4/5	3/5 (Colitis)	4/4	6/6
10	4/5	1/5 (Colitis)	3/4 (Colitis)	6/6
11	2/5 (Ether/guter AZ)	0/5 (Ether/schlechter AZ)	0/4 (Ether/schlechter AZ)	6/6
14	2/5	0/5	0/4	6/6

In Abb. 4-44 sind die Kolonlängen (*links*) und Milzgewichte (*rechts*) der verwendeten Tiere dargestellt. Die Ergebnisse sind jedoch kritisch zu beurteilen, da die Versuchsgruppen sehr klein waren und zum Teil starke Schwankungen innerhalb einer Gruppe auftraten. Deutlich war aber, dass alle Tiere, denen DSS über das Trinkwasser zugeführt wurde (Gruppe A1, B1, E1), im Vergleich zur Kontrollgruppe F eine Verkürzung des Kolons infolge einer akuten Entzündungsreaktion aufwiesen.

Bei dem Vergleich der Kolonlängen der Gruppen A1_11d und A1_14d (Tötung nach 11 bzw. 14 d) kann man bei der Gruppe A1_14d bereits wieder eine geringe Zunahme der Kolonlänge 14 Tage nach Versuchsstart beobachten. Dies und auch die Gewichtszunahme der Tiere ab Versuchstag 11 könnten möglicherweise auf eine erfolgreiche Therapie der akuten Colitis mit Silfar® SE 4 hindeuten.

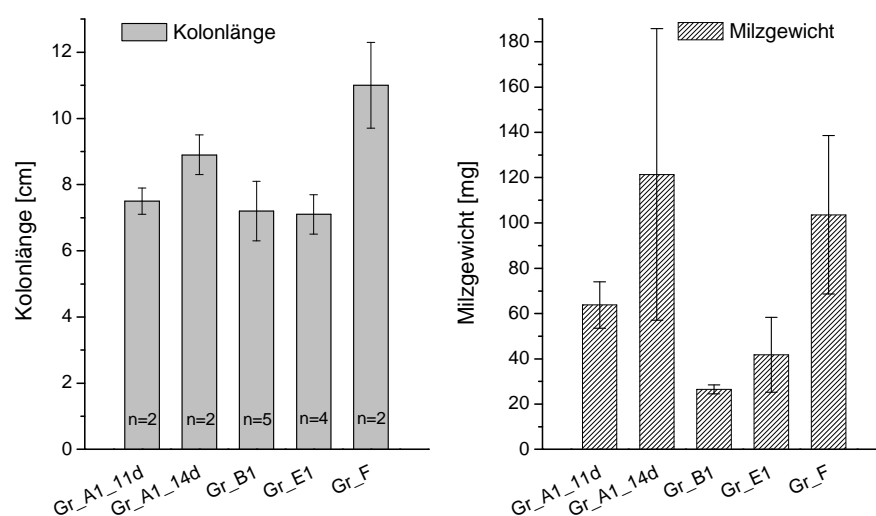
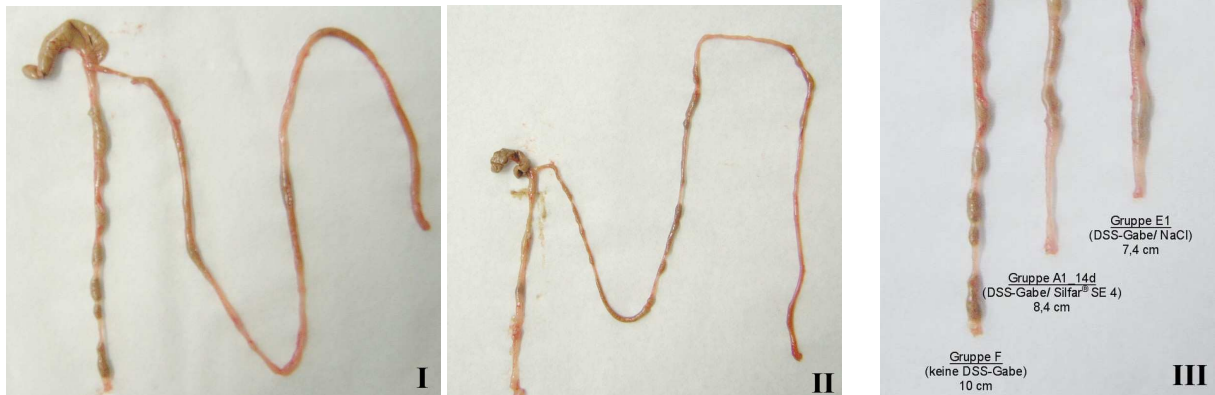


Abb. 4-44: *links:* Darstellung der Kolonlängen der getöteten Tiere; *rechts:* Darstellung der Milzgewichte der untersuchten Tiere; Gr_A1_11d – Tötung der Mäuse am Versuchstag 11; Gr_A1_14d – Tötung der Mäuse am Versuchstag 14; die Anzahl n der Tiere pro Gruppe ist für Milzgewicht und Kolonlänge gleich

Abb. 4-45: Bild I: Dünn- und Dickdarm einer gesunden, unbehandelten Maus aus Gruppe F; Bild II: Dünn- und Dickdarm einer Maus aus der Gruppe B1 (DSS-induzierte Colitis); Bild III: Vergleich der Kolonlängen von drei Mäusen aus verschiedenen Gruppen (Gruppe F, A1_14d, E1)



Die Kolonlängen der Tiere der Gruppen A1_11d, B1 und E1 unterschieden sich dagegen nicht signifikant. Von den DSS-behandelten Tieren waren nur bei den Mäusen der Gruppe A1_14d etwas größere Kolonlängen nachweisbar (Abb. 4-45; Bild III).

Auch am makroskopischen Erscheinungsbild des Darmes konnte man erkennen, ob es sich um den Dünn- bzw. Dickdarm einer gesunden Maus oder einer Maus mit DSS-induzierten Colitis handelt (Abb. 4-45; Bild I und II). Der Darm einer Maus mit Colitis war infolge der reduzierten Nahrungsaufnahme weniger gefüllt, insbesondere der Blinddarm war wesentlich kleiner als bei gesunden Mäusen. Häufig enthielt der Darm auch blutiges Sekret.

Außerdem wurde die Oberfläche der Koloninnenseite von einer gesunden Maus bzw. von einer Maus mit DSS-induzierter Colitis elektronenmikroskopisch^g untersucht (Abb. 4-46).

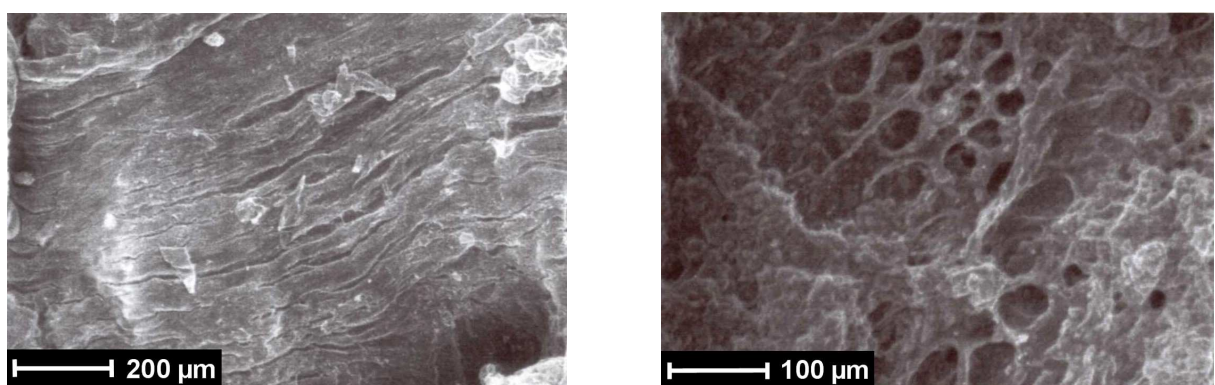


Abb. 4-46: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Koloninnenseite. *links*: Kolon einer gesunden, unbehandelten Maus; *rechts*: Kolon einer Maus mit DSS-induzierter Colitis

^g Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Dipl.-Ing. Ines Neubauer (AG Pharmakologische Hämostaseologie, Universitätsklinikum Jena), mittels eines XL30 ESEM (FEI Deutschland GmbH, Frankfurt/Main); Darstellung der nativen Proben möglich ohne weitere Präparation

In der Literatur wird eine Entzündung und Zerstörung der Mukosa des Darmepithels als Folge der DSS-Applikation beschrieben (179), was in Abb. 4-46 (*rechts*) deutlich sichtbar wird. Die Darmoberfläche der Maus mit DSS-induzierter Colitis zeigt eine löchrige Struktur (Abb. 4-46, *rechts*) im Gegensatz zur gesunden Maus (Abb. 4-46, *links*), deren Darmoberfläche gefaltet erscheint.

Weiterhin wurde das Milzgewicht bestimmt, um die Schwere der Colitis einzuschätzen. Da die Milz ein Organ des lymphatischen Systems ist, wird diskutiert, ob es bei der akuten Colitis als Folge der Entzündungsreaktion zu einer Zunahme des Milzgewichtes kommt (309,310).

Die in Abb. 4-44 (*rechts*) dargestellten Milzgewichte der getöteten Mäuse widersprechen jedoch dieser Vermutung und somit auch den Beobachtungen, die in der Literatur beschrieben wurden (309,310). Die Gruppen A1_11d, B1 und E1 wiesen ein deutlich geringeres Gewicht der Milz auf als die Kontrollgruppe F. Dies könnte möglicherweise auf eine Exsikkose der Tiere zurückgeführt werden, da die Mäuse mit einer ausgeprägten Colitis nur noch sehr geringe Mengen bzw. keine Flüssigkeit mehr aufnahmen und auch die Harnblase nur mit wenig Urin gefüllt war. Um diese Annahme zu bestätigen, könnte man in einem weiteren Versuch den Hämatokrit-Wert des Blutes bestimmen. Bei einer vorliegenden Exsikkose wäre dieser erhöht, d. h. in Relation zum verminderten Flüssigkeitsgehalt des Blutes ist der Anteil der roten Blutkörperchen erhöht. Interessanterweise konnte jedoch bei der Gruppe A1_14d bereits wieder ein höheres Milzgewicht bestimmt werden.

Der positive Einfluss von Silfar® SE 4 auf den Verlauf einer DSS-induzierten Colitis im Mausmodell sollte in einer weiteren Versuchsreihe bekräftigt und differenziert werden. Dazu wurden drei weitere Siliconölemulsionen ausgewählt (Gruppen: B2-M500/Poloxamer 188; C2-M500/Cremophor® EL; D2-M500/HSY 115), deren Herstellung mittels Hochdruckhomogenisation erfolgte (siehe Kapitel 3.5.2.1). Außerdem erhielt wieder eine Gruppe (E2) Natriumchloridlösung anstelle einer Siliconölemulsion. Alle Gruppen bekamen die Emulsion bzw. Lösung täglich einmal über einen Magenschlauch verabreicht, da sich diese Methode im ersten Versuch als Erfolg versprechender erwies als die Verdünnung der Emulsion mit dem Trinkwasser. Das Applikationsvolumen betrug jeweils 0,5 ml, welches einer Siliconölmenge von 0,012 g/Tag entsprach.

Die Gewichtsverluste der Mäuse der Gruppen A2-E2 sowie der Gruppe F sind in Abb. 4-47 dargestellt. Bis zum 9. Versuchstag zeigten die Gruppen A2-E2 eine Abnahme des Gewichtes. Anschließend konnte insbesondere bei der Gruppe E2 (NaCl-Lösung) eine Zunahme des Gewichtes der Mäuse beobachtet werden. Die weiteren untersuchten Gruppen (A2-D2) wiesen bis zum Versuchsende nur eine minimale Gewichtszunahme auf. Somit konnten leider die positiven Ergebnisse der ersten Versuchsreihe nicht bestätigt werden und auch eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Siliconölemulsionen war nicht möglich. Problematisch bei der Versuchsdurchführung war das Einführen des Magenschlauches, das bei den Mäusen häufig zu Verletzungen der Speiseröhre und folglich zu starken Blutungen mit teilweise tödlichem Ausgang führte. Daher wurden im Versuchsverlauf die Gruppen immer kleiner, und es traten starke Schwankungen des Gewichtsverlustes innerhalb einer Gruppe auf.

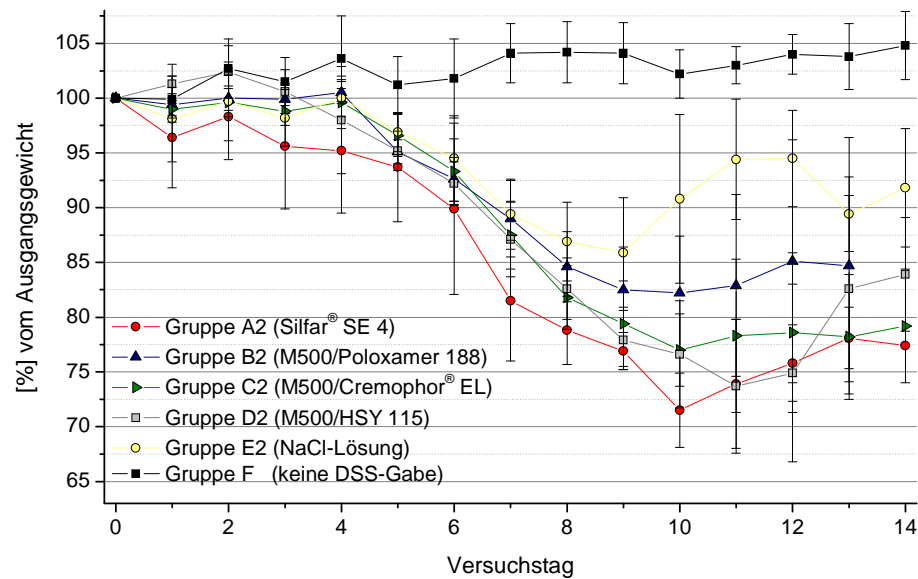


Abb. 4-47: Versuch 2 – Darstellung der Gewichtsverluste der Mäuse über den Versuchszeitraum von 14 Tagen. Zusatz von 2 % DSS zum Trinkwasser bis zum 6. Versuchstag; Start der Therapie parallel zur DSS-Gabe; Applikation der Emulsionen und Lösung via Magenschlauch (0,5 ml/Tag); Anzahl der Tiere pro Gruppe n=6

In einer dritten Reihe wurde nochmals versucht, den Verlauf einer DSS-induzierten Colitis im Mausmodell durch die Gabe von Siliconölemulsionen positiv zu beeinflussen. Der Versuchsablauf wurde beibehalten, das Applikationsvolumen via Magenschlauch wurde jedoch auf 0,3 ml reduziert (Erhöhung der Siliconölkonzentration in applizierter Emulsion, gleiche Siliconölmenge). Es erfolgte eine Erhöhung der Anzahl der Tiere pro Gruppe von 6 auf 10, um die im Versuch 2 auftretenden Schwankungen zu minimieren. Aber auch in diesem dritten Versuch konnte die im Versuch 1 beobachtete therapeutische Wirkung von Silfar® SE 4 bei einer DSS-induzierten Colitis nicht reproduziert werden. Es traten die gleichen Probleme wie bei Versuch 2 auf (Darstellung Gewichtsverlust - Anhang A6, Abb. A6-1) und auch die Überlebensraten sowie die Kolonlängen der Tiere ließen wie beim 2. Versuch keine Rückschlüsse auf eine erfolgreiche Therapie zu (nicht dargestellt).

Da sich bei der DSS-induzierten Colitis insbesondere die tägliche Applikation der Siliconölemulsionen via Magenschlauch als kritisch erwies, wurde nach einem alternativen Tiermodell gesucht. Dabei sollte es möglich sein, die Siliconölemulsionen den Tieren mit dem Trinkwasser zu verabreichen.

Bei der DSS-induzierten Colitis wurde dies zwar auch im Versuch 1 probiert, die Tiere der Gruppe B1 nahmen jedoch mehr Flüssigkeit als die der anderen Gruppen zu sich und demzufolge auch eine größere Menge DSS auf. Dies führte zu einem schwereren Krankheitsverlauf und schwer vergleichbaren Versuchsbedingungen der einzelnen Gruppen. Auch in Voruntersuchungen war bereits beobachtet worden, dass eine höhere DSS-Konzentration im Trinkwasser die Letalität der Tiere deutlich steigert. Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen das Modell der TNBS-induzierten Colitis ausgewählt.

4.5.2 TNBS-induzierte Colitis

Bei der TNBS-induzierten Colitis wird die toxische Substanz (TNBS) nicht über das Trinkwasser, sondern einmalig rektal appliziert (siehe auch Kapitel 2.3.4.2 und 3.5.3). Damit sollte eine gute Reproduzierbarkeit der Induktion der Colitis und folglich des Krankheitsverlaufes gewährleistet sein. Außerdem konnten somit die Siliconölemulsionen zur Therapie der Colitis problemlos mit dem Trinkwasser verdünnt werden und standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Siliconölkonzentration im Trinkwasser war im ersten TNBS-Versuch 1 % (m/m). Es wurden fünf verschiedene Emulsionen ausgewählt. Davon waren vier Siliconölemulsionen, die sich hinsichtlich des eingesetzten Emulgators bzw. in der Viskosität des formulierten Siliconöls unterschieden (Gruppe I, II, III und IV, siehe auch Einteilung der Versuchsgruppen Kapitel 3.5.3.1). Einerseits erfolgte die Untersuchung von Zubereitungen mit einer guten antibakteriellen Aktivität (M500/M5000 stabilisiert mit Poloxamer 188), andererseits wurden Emulsionen mit einem guten Ausbreitungsverhalten (M500 stabilisiert mit Cremophor® EL bzw. HSY 115) ausgewählt. Ergänzend wurde eine weitere O/W-Emulsion in den Versuch einbezogen, die jedoch kein Siliconöl, sondern das pharmazeutische Öl Miglyol® 812 als innere Phase enthielt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass ein möglicher auftretender therapeutischer Effekt spezifisch für die Emulsionen mit Siliconöl als Ölkomponente ist.

Entsprechend des DSS-Modells erfolgte eine tägliche Gewichtskontrolle der Mäuse (Ergebnisse nicht dargestellt). Aber auch hier traten starke Schwankungen innerhalb einer Gruppe auf, die keine schlüssigen Aussagen hinsichtlich des Krankheitsverlaufes erlaubten. Eindeutiger war dagegen der Vergleich der Überlebensraten der Mäuse, die in Abb. 4-48 dargestellt sind und in bis zu fünf Einzelversuchen ermittelt wurden. So erfolgte beispielsweise die Untersuchung der Emulsion der Gruppe I in 3 unabhängigen Versuchen (gleiche Versuchsdurchführung). Zur Auswertung wurden alle Mäuse der 3 Versuche zu einer Gruppe zusammengefasst (z.B. $n_{V1}=3$; $n_{V2}=6$; $n_{V3}=3 \rightarrow n_{ges}=12$).

Die höchste Letalität der Tiere am Versuchsende (Überlebensrate 13 %) wurde in Gruppe VI beobachtet, die nach der Induktion der Colitis nur reines Trinkwasser erhielt. Durch den Zusatz der Siliconölemulsionen zum Trinkwasser konnte in allen Gruppen (I-IV) die Letalität der Mäuse reduziert werden. Als besonders geeignet erwies sich dabei die Poloxamer 188-stabilisierte M5000-Siliconölemulsion (Gruppe I). In der Gruppe I wurde die Überlebensrate der Tiere auf 83 % erhöht und somit ein deutlicher Therapieerfolg erzielt.

Außerdem erfolgte die Untersuchung einer Poloxamer 188-stabilisierten M500-Siliconölemulsion (Gruppe II), die jedoch weniger effektiv war, wie die höhere Letalität der Tiere im Versuchsverlauf zeigte (Überlebensrate 44 %). Die Sterblichkeit der Tiere der Gruppe II war dennoch geringer im Vergleich zur Gruppe VI.

Ein ähnliches Verhalten wie das der Gruppe II konnte bei den Mäusen der Gruppe III (M500/Cremophor® EL; Überlebensrate 38 %) beobachtet werden. Erfolgreicher dagegen war die Therapie mit der HSY 115-stabilisierten M500-Emulsion (Gruppe IV). In dieser Gruppe konnte die Überlebensrate (67 %) nach der Gruppe I am stärksten erhöht werden.

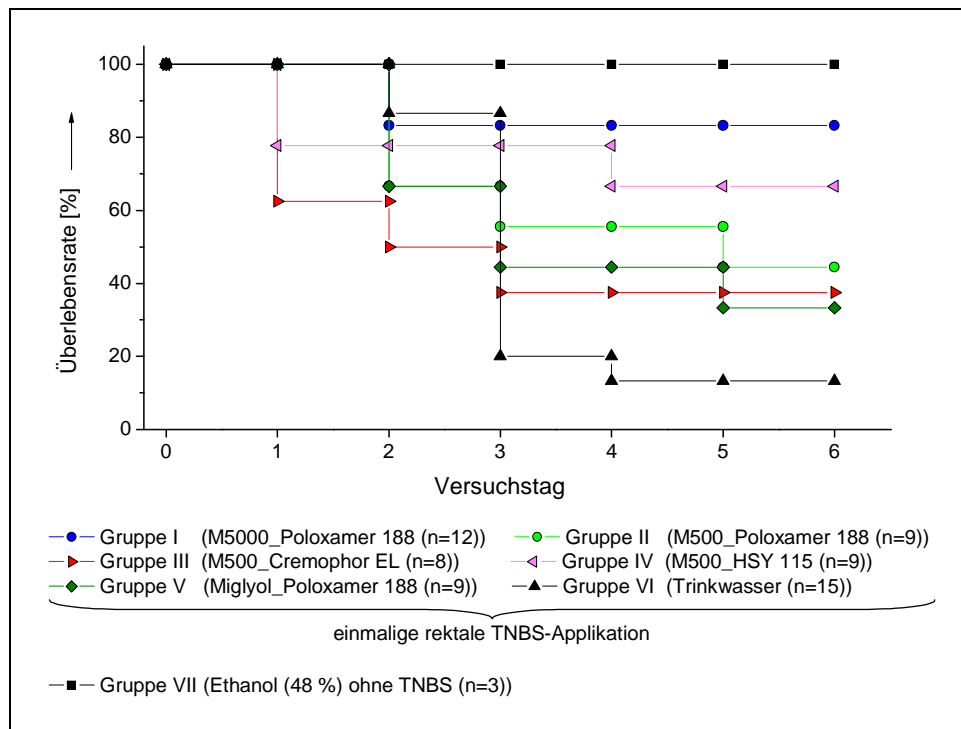


Abb. 4-48: Darstellung der Überlebensraten der Versuchsgruppen I-VII nach TNBS-induzierter Colitis über einen Versuchszeitraum von 6 Tagen; Gruppe I-V: Therapie der Mäuse mittels verschiedener Emulsionen, die mit dem Trinkwasser ad libitum zur Verfügung standen; Gruppe VI: Gabe von reinem Trinkwasser nach TNBS-Applikation; Gruppe VII: keine TNBS-Applikation

Die Emulsionen, die den Gruppen III und IV verabreicht wurden, zeigten beide keine antibakterielle Aktivität in den mikrobiologischen Untersuchungen mit *E. coli* 2332, aber es konnte ein gutes Ausbreitungsverhalten beobachtet werden.

Um das therapeutische Potenzial der untersuchten Siliconölemulsionen besser einschätzen zu können, wurde, wie bereits erwähnt, ergänzend eine Emulsion mit Miglyol® 812 und Poloxamer 188 den Tieren mit dem Trinkwasser zur Verfügung gestellt (Gruppe V). Die Gruppe V wies nur eine etwas erhöhte Überlebensrate (33 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (VI) auf, die ähnlich derer der Gruppen II und III war. Miglyol® 812 ist eine häufig eingesetzte Lipidkomponente in Zubereitungen zur parenteralen bzw. enteralen Ernährung, die als Energielieferant dient (311). Demzufolge ist es denkbar, dass die verringerte Letalität der Tiere der Gruppe V durch die erhöhte Energiezufuhr bedingt sein könnte.

Da außerdem sichergestellt werden sollte, dass die rektale Applikation von 48%igen Ethanol (Lösungsmittel für TNBS) keinen negativen Einfluss auf die Gesundheit der Mäuse nimmt, wurde dies an 3 Mäusen untersucht (Gruppe VII). Die Tiere zeigten jedoch keine krankhafte Reaktion infolge der Applikation (Überlebensrate 100 %).

Ergänzend zu der in Abb. 4-48 gewählten Möglichkeit der Auswertung (Zusammenfassung der Einzelversuche) wurden auch die Überlebensraten der einzelnen Versuche (V1-V5) gemittelt. Die Mittelwerte der Überlebensraten nach 6 Tagen sowie die entsprechenden Standardabweichungen sind im Anhang A7 (Abb. A7-1) dargestellt. Auch hier weist die Emulsion der Gruppe I

(M5000/Poloxamer 188-Emulsion) das größte therapeutische Potenzial auf und die Überlebensrate der Mäuse konnte im Vergleich zur Gruppe VI (Trinkwasser) deutlich gesteigert werden.

Wie auch bei der DSS-induzierten Colitis (Kapitel 4.5.2) erfolgte am Versuchsende die Entnahme von Kolon und Milz der Tiere sowie die Bestimmung derer Länge bzw. Gewicht (Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe siehe Abb. 4-49). In Abb. 4-49 sind die jeweiligen Mittelwerte der Kolonlängen und Milzgewichte der Gruppen I-VI dargestellt. Um die ermittelten Werte der Gruppen I-VI besser einordnen zu können, wurde außerdem die Gruppe F (Intaktkontrollgruppe; gesunde Tiere; gleiches Gewicht 20-22 g und gleiche Haltungsbedingungen; siehe auch Kapitel 3.5.1) aus der Versuchsreihe der DSS-induzierten Colitis zur Auswertung herangezogen. Auch bei diesem Versuch der TNBS-induzierten Colitis traten starke Schwankungen in Bezug auf die Kolonlänge der Tiere einer Gruppe auf (Abb. 4-49, *links*).

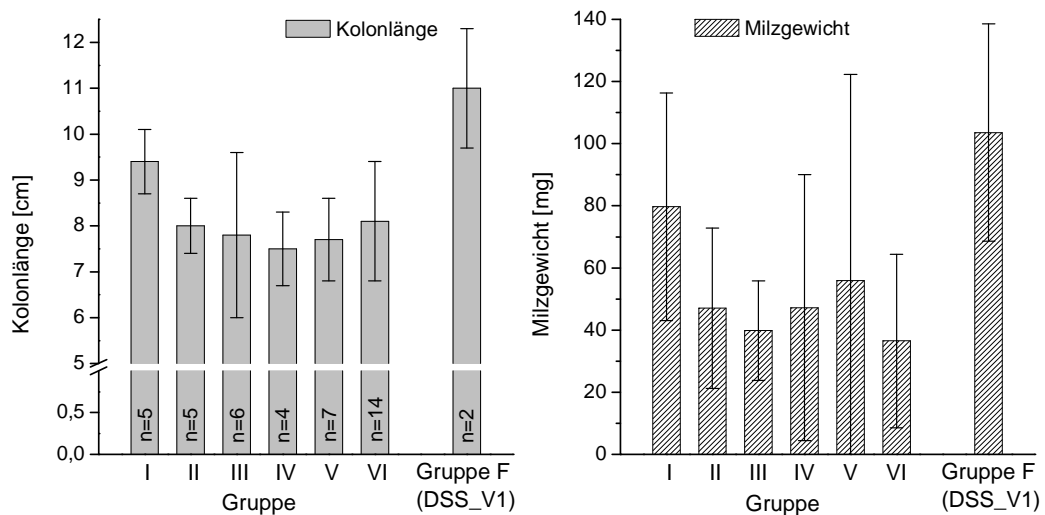


Abb. 4-49: *links:* Darstellung der Kolonlängen der getöteten Tiere; *rechts:* Darstellung der Milzgewichte der untersuchten Tiere; Gruppe F – Intaktkontrollgruppe des 1. Versuches der DSS-induzierten Colitis, keine DSS-Gabe, gesunde Tiere; die Anzahl n der Tiere pro Gruppe ist für Milzgewicht und Kolonlänge gleich

Auffallend war jedoch wieder, dass bei allen Gruppen mit einer induzierten Colitis (I-VI) eine Verkürzung des Dickdarms im Vergleich zu den gesunden Tieren der Gruppe F zu beobachten war. Die Gruppe I, bei der die höchste Überlebensrate der Mäuse festgestellt werden konnte, wies einen etwas größeren Mittelwert der Kolonlängen auf. In Abb. 4-50 ist allerdings zu erkennen, dass keine Maus der Gruppen I-VI sich in Bezug auf die Kolonlänge deutlich von den anderen Tieren abgrenzte.

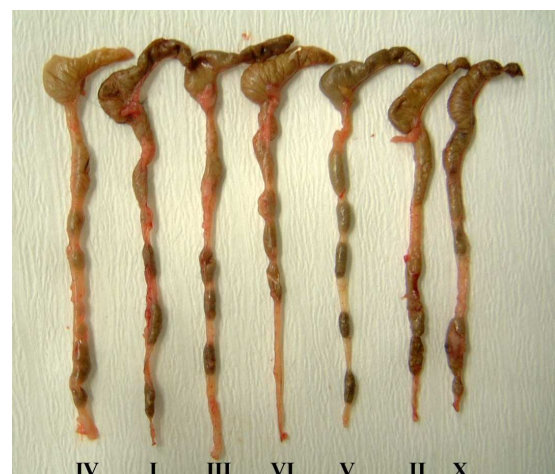


Abb. 4-50: Vergleich der Kolonlängen von Mäusen aus den Gruppen I-VI (TNBS-Versuch 1) sowie der Gruppe X (TNBS-Versuch 2)

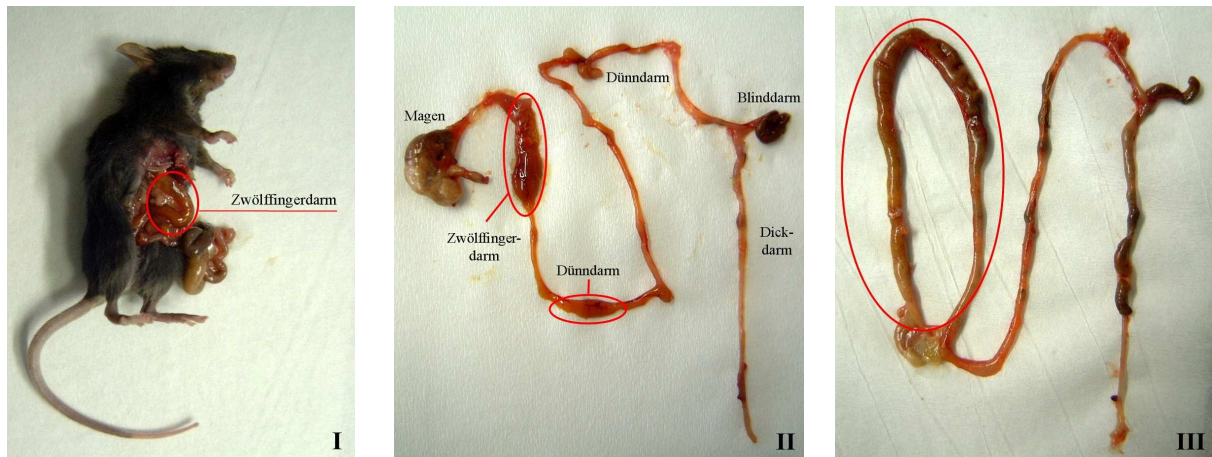


Abb. 4-51: Bild I – Sektion einer Maus, die an den Folgen einer TNBS-induzierten Colitis verendete; stark ödematöser Zwölffingerdarm; Bild II und III – Dün- und Dickdarm einer Maus mit ausgeprägter TNBS-induzierter Colitis; stark ödematöse Darmabschnitte rot eingekreist

Bei der Entnahme der Därme der Tiere, die an den Folgen der TNBS-induzierten Colitis starben, war auffällig, dass Teile des Dünndarms, insbesondere der Zwölffingerdarm, ödematös und mit Gallenflüssigkeit gefüllt waren (siehe Abb. 4-51). Häufig konnte auch eine Gelbfärbung der Peritonealwand bei den verendeten Mäusen beobachtet werden. Die rektale Applikation der TNBS-Lösung in den Dickdarm verursacht eine Reizung und Schädigung des Darmepithels. Als Folge tritt eine erhöhte Permeabilität der Darmwand auf, die möglicherweise zum Austritt von Gallenflüssigkeit in die Bauchhöhle führt. Auch das Vorhandensein von blutigen Darmabschnitten bei einigen Tieren lässt auf eine ausgeprägte Entzündungsreaktion schließen, die durch den therapeutischen Einsatz von ausgewählten Siliconölemulsionen positiv beeinflusst werden kann (siehe Abb. 4-48).

In Abb. 4-49 (*rechts*) sind weiterhin die Gewichte der entnommenen Milze dargestellt. Die Milzgewichte der Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Aber auch hier wurde ähnlich wie bei den Untersuchungen zu den Kolonlängen bei der Gruppe I ein etwas größerer Mittelwert bestimmt. Die Ergebnisse spiegeln jedoch das gleiche Bild wie bei der DSS-induzierten Colitis wider.

Das Milzgewicht nimmt infolge der akuten Entzündung des Darmes ab statt, wie in der Literatur beschrieben, zu (309,310). Wie bereits in Abschnitt 4.5.1 diskutiert, ist diese Reduktion des Milzgewichtes wahrscheinlich die Folge einer auftretenden Exsikkose.

Durch den Einsatz verdünnter Siliconölemulsionen ist es möglich, den Verlauf einer TNBS-induzierten Colitis im Mausmodell positiv zu beeinflussen und demzufolge die Überlebensrate der Tiere mittels ausgewählter Emulsionen deutlich zu erhöhen. Da diese Ergebnisse in mehreren unabhängigen Einzelversuchen entstanden und zur Auswertung zusammengefasst wurden (siehe oben), konnte auch eine gute Reproduzierbarkeit der Therapie der TNBS-induzierten Colitis beobachtet werden (Anhang A7; Abb. A7-1). Beim Vergleich der verschiedenen Siliconölemulsionen konnte, wie auch bereits bei den mikrobiologischen Untersuchungen, festgestellt werden, dass der Emulgator sowie die Viskosität des formulierten Siliconöls die Wirksamkeit der Zubereitung stark beeinflussen. Anhand der oben vorgestellten Untersuchungen wurde deutlich, dass die Emulsion mit dem höher

viskosen Öl M5000 und dem Emulgator Poloxamer 188 die Überlebensrate der Tiere besonders deutlich steigert. Die Viskosität des Siliconöls scheint von sehr großer Bedeutung für die therapeutische Wirksamkeit der Emulsionen zu sein. Diese Emulsion wies in den vorangegangenen Untersuchungen eine ausgeprägte antibakterielle Aktivität, aber weniger gute Ausbreitungseigenschaften auf.

Aufgrund der guten Wirksamkeit der Poloxamer 188-stabilisierten M5000-Emulsion wurde ergänzend eine konzentrationsabhängige Studie durchgeführt, um eine eventuell bestehende Dosis-Wirkungs-Beziehung aufzudecken (siehe Abb. 4-52). Die M5000-Emulsion wurde dazu in 4 verschiedenen Konzentrationen (0,1 %; 0,5 %; 1 %; 2 %) den Tieren mit dem Trinkwasser ad libitum zur Verfügung gestellt. In Abb. 4-52 sind die Überlebensraten der entsprechenden Gruppen (I, VIII-X) sowie der Gruppe VI (reines Trinkwasser) dargestellt. Auch hier trat bei der 1%igen M5000-Emulsion (Gruppe I) die geringste Letalität der Tiere auf. Die Gruppe mit der zweithöchsten Überlebensrate war überraschenderweise die Gruppe X mit nur 0,1 % Siliconöl im Trinkwasser. Die schlechteste Wirkung war dagegen bei der Gruppe IX (0,5 % M5000) gefolgt von der Gruppe VIII (2 % M5000) zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen keine Rückschlüsse auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu, da kein erkennbarer Zusammenhang zwischen Siliconölkonzentration und Überlebensrate besteht.

Auch die Kolonlängen (siehe Abb. 4-50; Vergleich Gruppe I und X) und Milzgewichte sowie das täglich bestimmte Gewicht der Mäuse (beide Parameter nicht dargestellt) erlauben, wie bereits bei den oben dargestellten Studien, keine eindeutigen Aussagen. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung zu klären, wären weitere Versuche erforderlich.

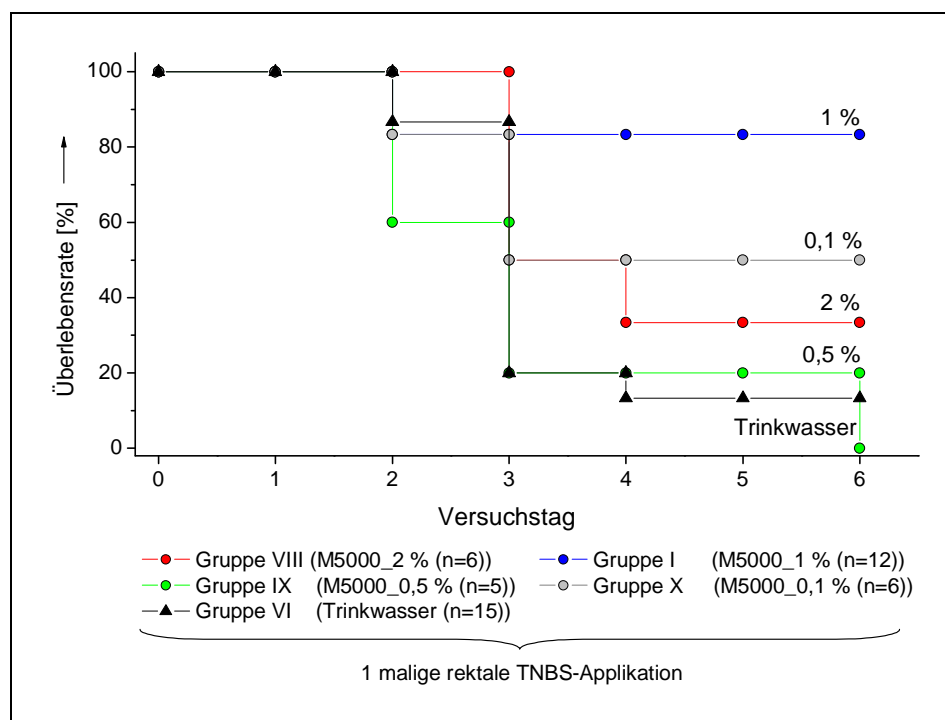


Abb. 4-52: Darstellung der Überlebensraten der Versuchsgruppen I, VI und VIII-X nach TNBS-induzierter Colitis über einen Versuchszeitraum von 6 Tagen; Gruppe I und VIII-X: Therapie der Mäuse mittels einer Poloxamer 188-stabilisierten M5000-Siliconölemulsion, die in verschiedenen Konzentrationen mit dem Trinkwasser ad libitum zur Verfügung stand; Gruppe VI: Gabe von reinem Trinkwasser nach TNBS-Applikation

4.5.3 Zusammenfassung

Das primäre Ziel der durchgeführten Tierversuche war es zunächst zu zeigen, dass sich der Einsatz von verdünnten Siliconölemulsionen positiv auf den Verlauf einer induzierten Colitis auswirkt. Aus diesem Grund wurden leicht und schnell zugängliche Parameter (Überlebensrate, Dickdarmlänge, Körper- und Milzgewicht) zur Beurteilung der Wirksamkeit ausgewählt. Das Modell der DSS-induzierten Colitis erwies sich dabei als weniger geeignet (siehe Kapitel 4.5.1). Dagegen zeigten die Ergebnisse der TNBS-induzierten Colitis eindeutig, dass insbesondere mittels einer Poloxamer 188-stabilisierten M5000-Siliconölemulsion (1 % im Trinkwasser) die Überlebensrate der Tiere um 70 % gesteigert und somit der Verlauf der Colitis positiv beeinflusst werden kann. Da als Folge der rektalen TNBS-Applikation eine Schädigung der intestinalen Barriere auftritt (185,189), ist es denkbar, dass durch die M5000-Emulsion ein Schutzfilm auf der Darmwand gebildet wird. Somit könnte die in der Literatur beschriebene erhöhte Invasion von Bakterien vermindert werden. Auch die ausgeprägte antibakterielle Aktivität der M5000-Emulsion (siehe Kapitel 4.4.2.2) könnte zu dem beobachteten Therapieerfolg beitragen.

Um die Wirkung der Siliconölemulsionen bei CED weiter zu studieren und zu differenzieren, sollten die tierexperimentellen Untersuchungen fortgesetzt werden. Eine Bestimmung weiterer Parameter (z.B. Myeloperoxidase-Aktivität, Hämatokrit-Wert) sowie histologische Untersuchungen wären dabei von Bedeutung (190). Auch eine Kontrolle der täglichen Trinkmenge der Tiere wäre sinnvoll, um die von den Tieren aufgenommenen Siliconölmengen vergleichen zu können.

5 Abschlussdiskussion

Die Zunahme der Häufigkeit von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ist ein weltweites Problem (121). Zur Therapie stehen verschiedene Arzneimittel zur Verfügung, die infolge unterschiedlicher Wirkmechanismen zu einer Verminderung der Entzündung im Darm führen (16). Oft tritt jedoch nicht nur eine Besserung des Krankheitsbildes auf, sondern es können auch starke Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie beobachtet werden (siehe Kapitel 2.3.3) (17). Die Zielsetzung einer optimalen Therapie ist die Induktion einer Remission, ein temporäres bzw. dauerhaftes Nachlassen der Krankheitssymptome.

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, dass es möglich ist, mit Siliconölen, aufgrund der besonderen Eigenschaften dieser Verbindungen (1), den Verlauf von entzündlichen Darmerkrankungen positiv zu beeinflussen. Da jedoch die Applikation von reinem Siliconöl eine schlechte Compliance der Patienten bedingen würde, wurden verschieden viskose Siliconöle mittels Hochdruckhomogenisation als O/W-Emulsionen formuliert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Emulsionen hinsichtlich der Partikelgröße, der Autoklavier- und Lagerstabilität sowie der Stabilität im künstlichen Magensaft. In Tab. 5-1 ist der Einfluss der zur Stabilisierung der Formulierungen eingesetzten Emulgatoren auf die Stabilität von M10- und M500-Emulsionen zusammengefasst (siehe auch Kapitel 4.1). Es konnten eine Reihe unterschiedlicher Emulsionsformulierungen mit geeigneten pharmazeutischen Eigenschaften entwickelt werden. Aufbauend auf den bei diesen Untersuchungen gewonnen Erkenntnissen wurden zunächst das Ausbreitungs- und Benetzungsverhalten sowie die antimikrobielle Aktivität ausgewählter Siliconölemulsionen untersucht.

Tab. 5-1: Zusammenstellung der Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen der M10- und M500-Siliconölemulsionen; Beurteilung der Emulsionen nach Sterilisation, Lagerung und Zusatz von künstlichem Magensaft hinsichtlich der Veränderung ihrer Partikelgröße; ■ stabil - Schwankung der Partikelgröße um $\pm 10\%$; ■ Zunahme der Partikelgröße um $> 10\%$; ■ Phasentrennung der Emulsion bzw. Zunahme der Partikelgröße $> 100\%$

	Autoklavierstabilität		Lagerstabilität (nA)		Stabilität im künstl. Magensaft
	M10	M500	M10	M500	M500
Cremophor® EL	■	■	■	■	■
Tween® 80	■	■	■	■	■
Span® 80	■	■	■	■	■
HLB 8,5	■	■	■	■	■
Poloxamer 188	■	■	■	■	■
Zuckerester S570	■	■	■	■	■
HPMC 90SH-100	■	■	■	■	■
Belsil® DMC 6031	■	■	■	■	■

Ein gutes Ausbreitungsverhalten der Siliconölemulsionen könnte den in der Literatur beschriebenen Filmbildungseffekt von Dimeticon auf der Darmmukosa sowie die Schleimhaut-schützende Wirkung fördern und folglich die gestörte intestinale Barriere bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa stärken (3,4). In den in Kapitel 4.3 vorgestellten Untersuchungen zeigten die Cremophor® EL-stabilisierten Formulierungen sowie die Emulsionen mit den beiden Silicontensiden Belsil® DMC 6031 und HSY 115 die kleinsten Kontaktwinkel und somit das beste Ausbreitungsverhalten auf einer hydrophoben Oberfläche. Dagegen konnten beim Vergleich der Emulsionen mit verschiedenen viskosen Siliconölen nur minimale Unterschiede festgestellt werden, wobei die Formulierung mit dem höher viskosen Siliconöl M5000 etwas schlechter spreitet. Besonders geeignet hinsichtlich ihres Ausbreitungs- und Benetzungsverhalten sind folglich Emulsionen mit niedrig viskosen Siliconölen sowie den Emulgatoren Cremophor® EL, Belsil® DMC 6031 und HSY 115.

Keine der entsprechenden M500-Formulierungen zeigte allerdings eine antibakterielle Aktivität bei den Untersuchungen mit dem Bakterium *E. coli* 2332 (siehe Kapitel 4.4.2). Eine antibakterielle Wirkung könnte jedoch das therapeutische Potenzial der Siliconölemulsionen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen positiv beeinflussen, da in der Pathogenese der CED eine erhöhte Konzentration an pathogenen Bakterien im Darm diskutiert wird (11,12). Emulsionen, die eine ausgeprägte antibakterielle Aktivität aufwiesen, waren die mit Poloxamer 188 und Tween® 80-stabilisierten Formulierungen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen zum Ausbreitungsverhalten erwies sich hier das hochviskose Siliconöl M5000, formuliert mit Poloxamer 188, als sehr wirksam. Aber auch für die Poloxamer 188-stabilisierte M500-Emulsion konnte eine gute antimikrobielle Wirksamkeit beobachtet werden (im Gegensatz zu den Cremophor® EL-, Belsil® DMC 6031- und HSY 115-stabilisierten M500-Emulsionen), die jedoch nicht bei der entsprechenden M10-Emulsion auftrat.

Da der oberflächenspannungsreduzierende Effekt der Formulierungen, bedingt durch das dispergierte Siliconöl, auch bei sehr geringen Ölkonzentrationen (0,035 %) noch nachweisbar war, wurden auch Siliconölemulsionen mit einer geringen Ölkonzentration hinsichtlich ihrer antibakteriellen Aktivität untersucht. Für eine Reduktion der Keimzahl von 10^6 KBE/ml waren Emulsionen mit einem recht hohen Siliconölgehalt von mindestens 25 % (Poloxamer 188) bzw. 10 % (Tween® 80) erforderlich.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Studien und der Untersuchungen hinsichtlich des Ausbreitungsverhaltens der Emulsionen auf hydrophoben Oberflächen korrelieren somit nicht. Emulsionen, die eine hohe antibakterielle Aktivität aufwiesen (M5000/Poloxamer 188), zeigten bei den Spreitungsversuchen etwas schlechtere Eigenschaften. Allerdings konnte bei beiden Studien festgestellt werden, dass Zubereitungen mit großen Partikeln (Median > 20 µm) von Vorteil sind.

Um das therapeutische Potenzial von Siliconölemulsionen bewerten zu können, erfolgte die Untersuchung ausgewählter Formulierungen abschließend am Tiermodell (siehe Kapitel 4.5). Einerseits wurden am Modell der TNBS-induzierten Colitis Emulsionen mit einem guten Ausbreitungsverhalten, wie die Cremophor® EL- und HSY 115-stabilisierten M500-Emulsionen, beurteilt. Die Emulsionen wurden mit dem Siliconöl M500 formuliert, da kein signifikanter Unterschied im Spreitungsverhalten zu M10 festgestellt werden konnte, die M500-Zubereitungen aber eine bessere Autoklavierstabilität

zeigten (siehe auch Tab. 5-1). Andererseits wurden Emulsionen mit einer deutlichen antibakteriellen Aktivität, die Poloxamer 188-stabilisierten M500- und M5000-Emulsionen, für die tierexperimentellen Studien ausgewählt. Trotz der Beobachtung, dass Emulsionen mit großen Partikeln eine bessere antibakterielle Wirkung bzw. ein besseres Ausbreitungsverhalten aufweisen, wurden die Emulsionen unter Standardherstellungsbedingungen formuliert. Bei den Formulierungen mit sehr großen Partikeln (Median > 20 µm) können Instabilitäten bei der Lagerung auftreten und bei der Applikation mit dem Trinkwasser im Tierversuch ist ein Aufräumen der Siliconölpartikel möglich.

Die Ergebnisse der TNBS-induzierten Colitis im Mausmodell zeigten eine deutliche Wirksamkeit der Poloxamer 188-stabilisierten M5000-Emulsion (Siliconölkonzentration im Trinkwasser 1 %) mit einer Steigerung der Überlebensrate der Tiere um 70 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Kapitel 4.5.2). Ergänzend wurde für diese M5000-Emulsion eine Studie zur Dosis-Wirkungs-Beziehung durchgeführt, die jedoch kein Zusammenhang zwischen Siliconölkonzentration im Trinkwasser und Überlebensrate der Tiere erkennen ließ. Folglich wären weitere Versuche sinnvoll, um die erhaltenen Ergebnisse aufzuklären.

Ein weniger ausgeprägter therapeutischer Effekt wurde dagegen bei der Versuchsgruppe beobachtet, die mit der Poloxamer 188-stabilisierten M500-Emulsion behandelt wurde (Steigerung der Überlebensrate um nur 31 %). Wie bei den mikrobiologischen Untersuchungen trat also auch bei den Tierversuchen ein Einfluss der Siliconölviskosität auf. Interessant war auch, dass die HSY 115-stabilisierte M500-Emulsion ein beachtliches therapeutisches Potenzial besaß (Steigerung der Überlebensrate um 53 %), obwohl bei den mikrobiologischen Studien keine antibakterielle Aktivität zu beobachten war. Allerdings wies die HSY 115-M500-Emulsion sehr gute Ausbreitungseigenschaften auf. Trotz eines ebenfalls guten Ausbreitungsverhaltens der Cremophor® EL-haltigen Formulierung, konnte die Überlebensrate der Gruppe, die mit dieser Emulsion behandelt wurde, nur um 24 % im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert werden.

Die Ergebnisse der physikochemischen, mikrobiologischen und tierexperimentellen Untersuchungen sind als Übersicht in Abb. 5-1 zusammengestellt. Anhand der gewonnen Erkenntnisse kann man der Poloxamer 188-stabilisierten M5000-Siliconölemulsion (Zusammensetzung siehe Tab. 5-2) das vermutlich größte therapeutische Potenzial der untersuchten Zubereitungen zur Behandlung der CED zusprechen.

Tab. 5-2: Zusammensetzung der Siliconölemulsion mit dem experimentell bestimmten größten Potenzial zur Therapie von CED

Substanz	Konzentration (m/m)
Poloxamer 188	2 %
Siliconöl M5000	35 %
2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4	ad 100 %

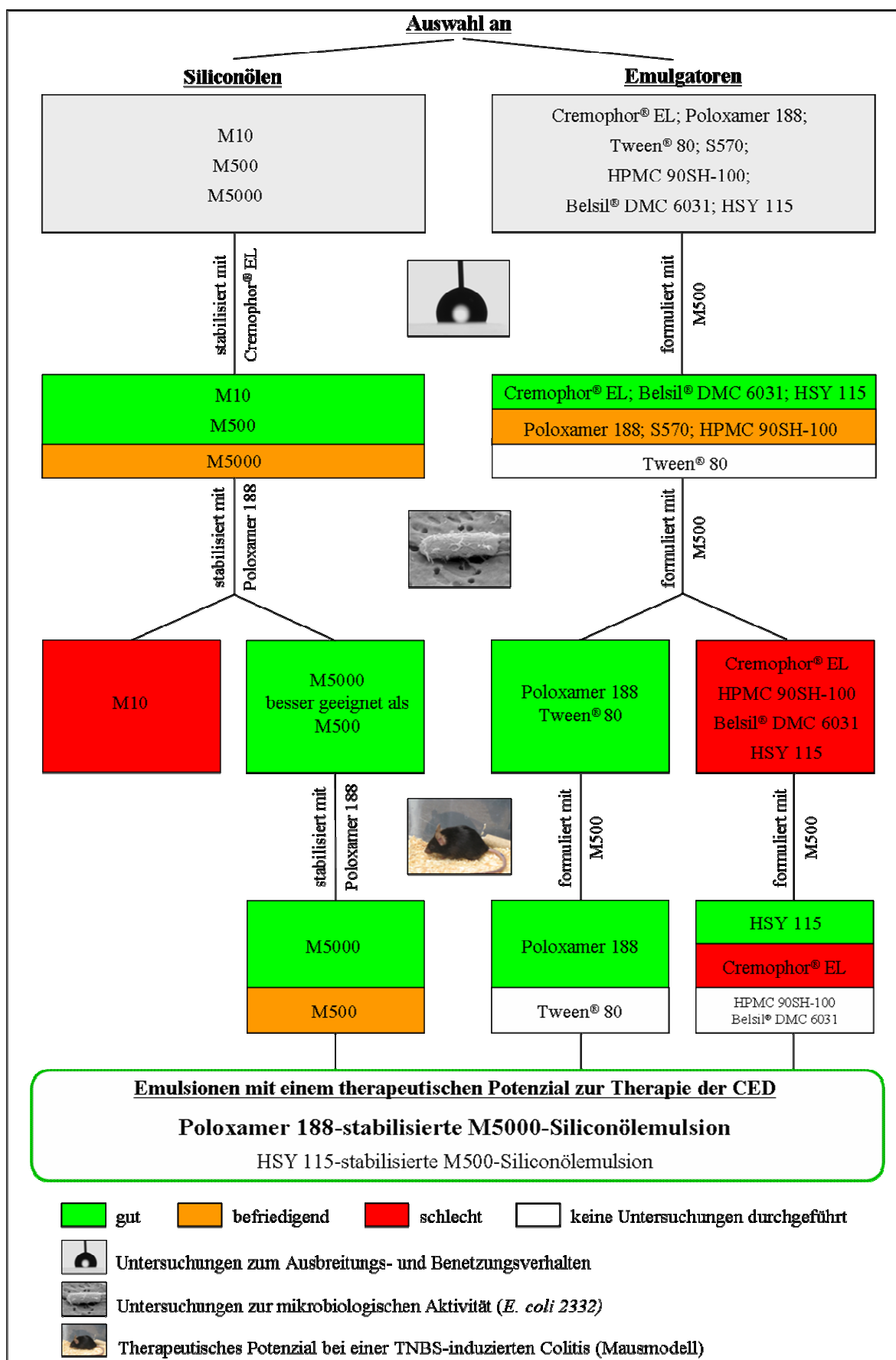


Abb. 5-1: Zusammenstellung und Beurteilung ausgewählter Siliconölemulsionen hinsichtlich ihres Ausbreitungs- und Benetzungsverhaltens, ihrer antibakteriellen Aktivität (gegenüber *E. coli* 2332) und ihrem therapeutischen Potenzial bei einer TNBS-induzierten Colitis im Mausmodell

Diese Formulierung erwies sich nicht nur in den mikrobiologischen und tierexperimentellen Studien als sehr viel versprechend, sondern zeigte auch eine gute Autoklavier- und Lagerstabilität. Die Stabilität im künstlichen Magensaft wurde nicht untersucht, allerdings konnte bei der entsprechenden M500-Emulsion keine Instabilität in Folge des niedrigen pH-Wertes bzw. der hohen Ionenkonzentration beobachtet werden (siehe Tab. 5-1). Die Magensaftstabilität ist vor allem abhängig vom Emulgator an der Grenzfläche des Tröpfchens und nicht von der Ölkomponente der Emulsion. Somit kann man auch von einer ansprechenden Stabilität der M5000-Emulsion im künstlichen Magensaft ausgehen.

Nur bei den Untersuchungen zum Ausbreitungs- und Benetzungsverhalten zeigten die hochviskosen Siliconöle sowie die Formulierungen mit Poloxamer 188 etwas schlechtere Eigenschaften. Da jedoch alle Siliconöle prinzipiell gute Filmbildungseigenschaften aufweisen, scheint die etwas schlechtere Spreitung der Poloxamer 188-stabilisierten Siliconölemulsion im Vergleich zu den Cremophor® EL-stabilisierten Formulierungen nur einen geringen Einfluss auf das therapeutische Potenzial zu haben. Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Ausbreitungs- und Benetzungsverhalten besitzen Modellcharakter und wurden unter stark simplifizierten Bedingungen durchgeführt. Im menschlichen Darm findet man keine homogene, trockene Oberfläche sowie eine anders zusammengesetzte Gasphase vor. Es ist denkbar, dass der schützende Siliconölfilm auf der Darmoberfläche durch eine hohe Viskosität des Siliconöls robuster ist, was auch die gute Wirkung der Poloxamer 188-stabilisierten M5000-Siliconölemulsion im Mausmodell erklären könnte.

Interessant war, dass durch die Applikation der HSY 115-stabilisierten M500-Emulsion die Überlebensrate der Mäuse mit TNBS-induzierter Colitis am zweitstärksten erhöht wurde. Die Emulsion zeigte ein gutes Ausbreitungsverhalten, aber keine antimikrobielle Wirkung. Kritisch ist jedoch die schwierige Herstellung der Emulsion aufgrund des geringen Cloud-Points des Emulgators HSY 115 (1%ige Lösung: $34,1^{\circ}\text{C} \pm 0,4^{\circ}\text{C}$). Folglich könnte man eine Instabilität bei der Lagerung der Emulsion vermuten (268,269), die eine therapeutische Anwendung der Zubereitung nur schwer erlauben dürfte.

Die in der Therapie der TNBS-induzierten Colitis besonders wirksame Poloxamer 188-stabilisierte M5000-Emulsion besitzt eine ausgeprägte antibakterielle Aktivität. Diese antibakteriellen Eigenschaften der Emulsion könnten dazu beitragen, dass der erhöhte Anteil an pathogenen Keimen im Darm von CED-Patienten reduziert wird (11,151). Problematisch könnte möglicherweise der Einfluss der Siliconölemulsionen auf die physiologische Darmflora sein. Da die Emulsionen wie im Mausmodell verdünnt angewendet würden, ist von einer nachhaltigen Schädigung der natürlichen Darmflora nicht auszugehen, da die Keimdichte (Pilze und Bakterien) im Dünndarm mit 10^7 - 10^9 KBE pro Milliliter Sekret vergleichsweise hoch ist (312). Außerdem wurde in den Untersuchungen mit *E. coli* 2332 gezeigt, dass ein bestimmtes Verhältnis von Siliconölkonzentration und Bakterienanzahl für eine antibakterielle Wirkung erfüllt werden muss. Dies würde auch die Vermutung nahe legen, dass die antibakterielle Wirkung der Siliconölemulsionen im Darm nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die Tierversuche sprechen aber für eine Bedeutung der antibakteriellen Aktivität der Emulsion.

In den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der mit Siliconölemulsion behandelten Bakterien *E. coli* 2332 war zu erkennen (siehe auch Abb. 4-38, Seite 115), dass die Bakterien 24 h nach Versuchsstart keine sichtbaren Fimbrien mehr aufwiesen. Diese sind jedoch bei der Adhäsion und Kolonisation an Zelloberflächen von großer Bedeutung. Da bei Patienten mit einer CED eine erhöhte Permeabilität der intestinalen Barriere vor und während eines Entzündungsschubes festgestellt werden konnte (10,142,143), könnten fehlende Fimbrien eine verminderte Invasion von Bakterien durch die intestinale Barriere bewirken. Im Hinblick auf die erhöhte Permeabilität der intestinalen Barriere können, wie bereits erwähnt, auch die Filmbildungseigenschaften der Siliconölemulsionen von großem Nutzen sein. Durch die Ausbildung eines Schutzfilmes auf der Darmmukosa würden die Adhäsion und das Eindringen von pathogenen Mikroorganismen ins Epithel zusätzlich eingeschränkt. Bereist Knut Fischer vermutete 1982 im Rahmen seiner erfolgreichen Untersuchungen zur Bekämpfung der Aufzuchtkrankheit Kolienterotoxämie mittels Espumisan®-Granulat als Wirkmechanismus des Präparates eine „Silikonisierung“ der Darmwand (313). Ein Schutzfilm auf der Darmmukosa würde wahrscheinlich auch die Resorption von Endotoxinen hemmen und dementsprechend die Endotoxinkonzentration im Blutkreislauf senken, die bei CED-Patienten erhöht ist (299). Fischer diskutierte außerdem eine Umhüllung des toxischen Lipid-A-Anteils von Endotoxin mit Siliconpartikeln. Die Filmbildungseigenschaften, die ausgeprägte antibakterielle Aktivität sowie die positiven Ergebnisse der Tierversuche lassen darauf schließen, dass die Poloxamer 188-stabilisierte M5000-Emulsion vermutlich ein hohes Potenzial zur Therapie der CED besitzt.

Da die bisherigen medikamentösen Therapien der CED zum Teil starke Nebenwirkungen aufweisen, ist der vermutlich größte Vorteil der Siliconölemulsionen ihre gute physiologische Verträglichkeit (18). In tierexperimentellen und humanen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Dimeticone nach oraler Applikation nahezu nicht resorbiert und unverändert ausgeschieden werden.

Um jedoch auszuschließen, dass keine bzw. nur eine minimale Penetration der Siliconöltröpfchen in das Gewebe auftritt, wären ergänzende Untersuchungen erforderlich. In ersten Versuchen wurde bereits die Anfärbung der Siliconöle mit in der Literatur als geeignet beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffen wie beispielsweise DiI durchgeführt (314). Das Ziel war dabei, eine eventuell auftretende Interaktion von Siliconöltröpfchen und Zelle zu visualisieren. Da die Emulsion erst nach der Herstellung mit einer ethanolischen Farbstofflösung versetzt wurde, lag der Farbstoff auch in der wässrigen Phase vor, in der jedoch keine Fluoreszenz auftrat. Beim Zusatz der Emulsion zum Zelllayer diffundierte der Farbstoff unabhängig von einer Interaktion von Zellwand und Siliconöltröpfchen in die Zellmembran. Folglich kann auf diese Weise die spezifische Interaktion bzw. Penetration der Siliconöltröpfchen mit der bzw. in die Zellwand nicht studiert werden.

Aufgrund der geringen Toxizität der Siliconöle und dem gezeigten therapeutischen Potenzial wäre der Einsatz einer Siliconölemulsion bei CED als äußerst nützlich anzusehen. Auch der geringere Kostenfaktor der Emulsionen im Vergleich zu teuren Immunsuppressiva ist ein wichtiger Aspekt. Siliconölemulsionen sind allerdings in einem akuten Entzündungszustand des Gastrointestinaltraktes vermut-

lich nicht als Monotherapie einzusetzen, doch wäre eine adjuvante Therapie durchaus denkbar. Auch eine dauerhafte orale Applikation könnte möglicherweise zu einer Induktion bzw. Aufrechterhaltung einer Remission führen und wäre aufgrund des minimalen toxischen Potenzials von Siliconöl als unbedenklich einzuschätzen.

Um eine therapeutische Anwendung bei CED-Patienten zu realisieren, wären zunächst ergänzende Tierversuche sinnvoll. In diesen Studien sollte die Frage des Einflusses der antibakteriellen Aktivität geklärt und sichergestellt werden, dass die intestinale Darmflora nicht nachhaltig geschädigt wird. Außerdem wäre die Bestimmung weiterer physiologischer und histologischer Parameter sowie der erneute Versuch eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erstellen sinnvoll.

Als potenzielle Formulierung für diese Untersuchungen erwies sich, wie oben erläutert, die Poloxamer 188-stabilisierte M5000-Emulsion (siehe Tab. 5-2). Der Emulgator Poloxamer 188 und das Siliconöl M5000 sind beides Substanzen, die bereits zur Zubereitung pharmazeutischer Formulierungen zugelassen sind. Aber auch die Bestimmung des therapeutischen Potenzials von Tween® 80- und HSY 115-stabilisierten M5000-Siliconölemulsionen wäre interessant (siehe Abb. 5-1). Die M500-Emulsion mit Tween® 80 zeigte in den mikrobiologischen Studien eine gute antibakterielle Wirksamkeit, während sich die HSY 115-stabilisierte M500-Emulsion bereits im Tierversuch als wirksam erwies.

Auch die weitere Untersuchung einer kommerziellen Zubereitung, wie beispielsweise Silfar® SE 4, wäre interessant. Bei den Studien zur DSS-induzierten Colitis konnten bereits erste Therapieerfolge mit der kommerziellen Emulsion Silfar® SE 4 erzielt werden, die jedoch aufgrund der auftretenden Schwierigkeiten bei der täglichen Applikation der Emulsion via Magenschlauch nicht reproduzierbar waren (siehe Kapitel 4.5.1). In die Behandlung der TNBS-induzierten Colitis wurden zunächst keine kommerziellen Präparate (z.B. Espumisan® Emulsion) einbezogen, da insbesondere der Einfluss von Ölkomponente und Emulgator auf das therapeutische Potenzial beurteilt werden sollte. Da die freiverkäuflichen Zubereitungen eine andere Zusammensetzung aufweisen und deutlich niedriger dosiert sind, wäre zunächst zu prüfen, ob diese Formulierungen ein annähernd gleiches Potenzial zur Therapie der CED besitzen. Des Weiteren wird in den kommerziell verfügbaren Produkten üblicherweise Simeticon (Siliconöl+SiO₂) eingesetzt. In den hier untersuchten Emulsionen wurde allerdings nur reines Siliconöl (Dimeticon) verwendet. Auch ein Vergleich dieser beiden Substanzen (Dimeticon und Simeticon), die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Entschäumer unterscheiden, aber gleiche Filmbildungseigenschaften aufweisen (3), wäre in weiteren Untersuchungen vorstellbar.

Das beobachtete therapeutische Potenzial der untersuchten Siliconölemulsionen könnte möglicherweise auch zur Behandlung anderer Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes genutzt werden. So ist beispielsweise der Einsatz bei *H. pylori*-Infektionen denkbar, da in der Literatur bereits eine Empfindlichkeit des anaeroben Bakteriums gegenüber Simeticon beschrieben wurde (9). Auch hier könnten die guten Filmbildungseigenschaften sowie die antibakterielle Aktivität der Siliconölemulsionen von Nutzen sein. Außerdem könnte die hohe Löslichkeit verschiedener Gase wie z.B. Sauerstoff und

Stickstoff in Siliconölen ausgenutzt werden (51). Würde man die Siliconöle vor der Applikation mit Sauerstoff begasen, ist es denkbar, dass deren antibakterielle Aktivität insbesondere gegenüber anaeroben Keimen erhöht ist.

Eine weitere Anwendung wäre der Einsatz von Siliconölemulsionen als Träger für Wirkstoffe (z.B. Antibiotika, Antiphlogistika), um das therapeutische Potenzial zu erhöhen und möglicherweise die Wirkstoffkonzentration reduzieren zu können. Aufgrund der Filmbildungseigenschaften, könnten die Siliconöltröpfchen an der Darmwand spreiten und direkt am möglichen Wirkort den Arzneistoff freisetzen. Dazu wären jedoch intensive Untersuchungen hinsichtlich Löslichkeit und Freisetzung des Wirkstoffes nötig.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass bestimmte Siliconölemulsionen abhängig von der Zusammensetzung, insbesondere von der Wahl des Emulgators sowie von der Konzentration und der Viskosität des Siliconöls, ein ausgeprägtes therapeutisches Potenzial bei entzündlichen Darmerkrankungen im Tiermodell aufweisen. Als besonders geeignet erwies sich dabei die Poloxamer 188-stabilisierte M5000-Siliconölemulsion (siehe Tab. 5-2). Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist eine Anwendung von ausgewählten Siliconölemulsionen bei Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn anzustreben. Voraussichtlich würde die regelmäßige orale Applikation der Siliconölemulsionen das Ausmaß der Entzündung im Darm bei CED-Patienten reduzieren und zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsverlaufes führen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das therapeutische Potenzial von Siliconölemulsionen zur Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht.

Da die perorale Applikation von reinem Siliconöl eine schlechte Compliance der Patienten bedingen würde, wurden Siliconöle mittels Hochdruckhomogenisation als O/W-Emulsionen formuliert. Dazu wurde eine Auswahl an Emulgatoren sowie unterschiedlich viskoser Siliconöle (M10-M5000) verwendet. Die Beurteilung der Emulsionen erfolgte zunächst hinsichtlich ihrer Partikelgröße sowie ihrer Autoklavier- und Lagerstabilität. Dabei konnte beobachtet werden, dass sowohl der Emulgator als auch die Viskosität der inneren Phase die Partikelgröße der Emulsionen deutlich beeinflussen. Die Partikelgröße der Emulsionen nahm mit der Viskosität der Siliconöle zu. Emulsionen mit niedrig viskosen Siliconölen wiesen kleinere Partikel auf, zeigten aber abhängig vom eingesetzten Emulgator eine Autoklavierinstabilität (Poloxamer 188, Tween® 80, Cremophor® EL). Bei der Untersuchung der Lagerstabilität über einen Zeitraum von einem Jahr zeigten nur die Span® 80- sowie die Belsil® DMC 6031-stabilisierten Emulsionen eine Zunahme der Partikelgröße bzw. eine Phasentrennung. Diese beiden Emulgatoren erwiesen sich bereits beim Autoklavieren der M500-Proben als ungeeignet für die Formulierung der Siliconölemulsionen. Problematisch war auch die teilweise starke mikrobielle Kontamination der Zuckerester-stabilisierten Emulsionen.

Außerdem wurde die Stabilität ausgewählter M500-Emulsionen im künstlichen Magensaft (ohne Zusatz von Pepsin) untersucht. Trotz der stark veränderten Umgebungsbedingungen (pH-Wert, Ionenkonzentration) im künstlichen Magensaft zeigten, mit Ausnahme der untersuchten Zuckerester-Formulierungen, alle M500-Emulsionen eine Partikelgrößenstabilität.

Folglich sind insbesondere die Emulgatoren Cremophor® EL, Tween® 80, Poloxamer 188, Lipoid S100, HPMC 90SH-100 sowie das Emulgatorgemisch von Span® 80 und Tween® 80 (HLB 8,5) hinsichtlich Lager- und Autoklavierstabilität sowie der Stabilität im künstlichen Magensaft zur Formulierung von M500-Siliconölemulsionen geeignet.

Weiterhin erfolgte die Formulierung von Siliconölemulsionen mit unterschiedlich viskosen Siliconölen aber gleicher Partikelgröße unter Standardherstellungsbedingungen. Dies wurde durch den Zusatz eines Viskositätserhöhers (PEG 400) zur äußeren Phase erreicht. Diese Ergebnisse konnten auch auf eine ausgewählte Rezeptur von Lipidnanopartikeln übertragen werden.

Neben den grundlegenden Studien zur Stabilität der hergestellten Siliconölemulsionen wurde untersucht, ob die in der Literatur beschriebene Oberflächenaktivität und die antimikrobielle Wirksamkeit der reinen Siliconöle auch für die entsprechenden Emulsionen nachweisbar sind. Diese Eigenschaften der Siliconöle könnten sich positiv auf die Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mittels Siliconölemulsionen auswirken.

Das Ausbreitungs- und Benetzungsverhalten der Siliconölemulsionen wurde auf verschiedenen hydrophoben Oberflächen studiert. Siliconölemulsionen mit dem Emulgator Cremophor® EL erwiesen sich aufgrund eines geringen Kontaktwinkels und einer geringen Oberflächenspannung als besonders geeignet. Zwischen den Emulsionen mit den unterschiedlich viskosen Siliconölen konnten nur geringe Unterschiede beobachtet werden. Die Formulierungen mit dem hoch viskosen Siliconöl M5000 wiesen ein etwas schlechteres Ausbreitungsverhalten auf. In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass nicht nur der Emulgator, sondern auch das emulgierte Siliconöl die Oberflächenspannung der Emulsionen deutlich reduziert. Dieser Effekt konnte auch für sehr geringe Siliconölkonzentrationen (bis zu 0,035 %) noch nachgewiesen werden.

Eine mögliche antimikrobielle Wirkung ausgewählter Siliconölemulsionen wurde zunächst unter Anwendung der “Prüfung auf ausreichende Konservierung“ (Ph. Eur. 5.1.3) beurteilt. Der im Rahmen dieser Studien beobachtete antibakterielle Effekt bestimmter Formulierungen wurde in weiteren Untersuchungen mit dem gramnegativen Bakterium *E. coli* 2332 differenziert. Dabei erwiesen sich die Poloxamer 188-stabilisierten Emulsionen mit den Siliconölen M500 und M5000 (Ölgehalt 35 %) als besonders wirksam. Auch die M500-Formulierung mit Tween® 80 zeigte eine ausgeprägte antibakterielle Aktivität. Der beobachtete antibakterielle Effekt der Siliconölemulsionen war folglich stark abhängig von der Zusammensetzung der Emulsion (Emulgator, Ölkomponente sowie Zusammensetzung der äußeren Phase) wie auch von der Keim- bzw. Siliconölkonzentration. Es waren hochkonzentrierte Emulsionen zur Reduktion der Keimzahl von 10^6 KBE/ml erforderlich. Die Formulierungen mit dem Siliconöl M10 sowie mit anderen pharmazeutischen Ölen (z.B. Sojaöl), stabilisiert mit Poloxamer 188, sowie die M500-Emulsionen, die mit weiteren Emulgatoren (z.B. Cremophor® EL; HLB 8,5) hergestellt wurden, wiesen keine ausgeprägte antibakterielle Aktivität auf.

Sowohl bei den mikrobiologischen als auch bei den Untersuchungen zum Ausbreitungs- und Benetzungsverhalten der Emulsionen wurde der Einfluss der Partikelgröße der Emulsionen berücksichtigt. Bei beiden Studien konnten bei den Zubereitungen mit sehr großen Partikeln (Median > 20 µm) etwas bessere Eigenschaften beobachtet werden, zwischen Formulierungen mit kleinen und mittelgroßen Partikeln war keine Differenzierung möglich.

Abschließend erfolgte die Beurteilung des therapeutischen Potenzials ausgewählter Siliconölemulsionen im Tiermodell. Die viel versprechenden Ergebnisse der Therapie der DSS-induzierten Colitis mit dem kommerziellen Präparat Silfar® SE 4 konnten in weiteren Versuchen nicht reproduziert werden. Bei der TNBS-induzierten Colitis im Mausmodell konnte dagegen reproduzierbar gezeigt werden, dass die mit dem Trinkwasser verdünnte Poloxamer 188-stabilisierte M5000-Emulsion (Siliconölkonzentration 1 %) eine deutliche Wirksamkeit besitzt. Die Überlebensrate der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Trinkwasser) konnte um 70 % gesteigert werden. Ein geringer ausgeprägter therapeutischer Effekt wurde bei der HSY 115-stabilisierten M500-Emulsion beobachtet.

In dieser Arbeit wurden in ihrer Zusammensetzung systematisch variierte Siliconölemulsionen hinsichtlich ihrer technologischen, grenzflächenchemischen und mikrobiologischen Eigenschaften untersucht. Anhand der Ergebnisse konnte eine Auswahl an Emulsionen getroffen werden, die zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen geeignet sein könnten. Aufgrund der weiterführenden Studien am Tiermodell ist es denkbar, dass insbesondere die Poloxamer 188-stabilisierte M5000-Emulsion ein therapeutisches Potenzial bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa besitzen könnte.

7 Summary

In this work, the therapeutic potential of silicone oil emulsions for the treatment of inflammatory bowel diseases was studied.

Due to the inconvenient peroral administration of pure silicone oil, silicone oils were formulated as O/W emulsions by high pressure homogenization. Different types of emulsifying agents as well as silicone oils with different viscosities (M10-M5000) were used. Firstly, the emulsions were evaluated concerning their particle size. Furthermore, the influence of steam sterilization and storage stability were studied. It was shown that the type of emulsifier as well as the internal phase viscosity significantly influenced the particle size of the emulsion which increased for higher silicone oil viscosities. Emulsions prepared with low viscous silicone oils, consequently exhibiting smaller particles, partially displayed an increased mean particle size after sterilization dependent on the utilized emulsifier (Poloxamer 188, Tween® 80, Cremophor® EL).

Over a storage period of one year only the emulsions stabilized with Span® 80 and Belsil® DMC 6031 displayed an increase in particle size and a phase separation, respectively. These emulsifiers were already shown to be inappropriate for stabilizing the M500-emulsions as the M500-particle size increased upon sterilization. Moreover, sugar ester stabilized emulsions turned out to be susceptible to microbial contamination.

The particle size stability of selected M500-emulsions in artificial gastric juice (without pepsin) was investigated, too. With the exception of sugar ester stabilized emulsions which displayed an increase in the mean particles size, all emulsions were stable under these conditions (low pH-value, high salt concentration).

Consequently, the emulsifiers Cremophor® EL, Tween® 80, Poloxamer 188, Lipoid S100, HPMC 90SH-100 as well as the mixture of Span® 80 and Tween® 80 (HLB 8,5) are well suited for preparation of M500-silicone oil emulsions, particularly concerning the storage and sterilization stability as well as the stability in artificial gastric juice.

Furthermore, silicone oil emulsions with comparable particle size distributions were prepared from silicone oils with different viscosities applying standard homogenization conditions. This was achieved by adding a viscosity modifier (PEG 400) to the aqueous phase. This methodology was also successfully transferred to a lipid nanoparticle formulation.

In addition to the basic stability studies of the prepared silicone oil emulsions, it was investigated if the surface and the antimicrobial activity described for pure silicone oils in the literature are still present in silicone oil emulsions. Those properties are expected to be valuable for the therapy of inflammatory bowel disease.

The spreading properties of the emulsions were studied on different surfaces, using lipid coated glass substrates to simulate cellular surfaces. Particularly, emulsions stabilized by the emulsifier

Cremophor[®] EL seemed to be well suited for coating cellular surfaces, since they displayed a low contact angle and a low surface tension. Emulsions prepared with silicone oils of different viscosities showed similar spreading properties, whereas emulsions containing the high viscous silicone oil M5000 have slightly poorer spreading properties than emulsions prepared with lower viscous silicone oils. Furthermore, it could be shown that in addition to the emulsifier the emulsified silicone oil led to a significant reduction of the surface tension of the emulsions. This effect was observed down to very low silicone oil concentrations of about 0.035 %.

The antimicrobial activity of selected silicone oil emulsions were evaluated using the “Test for efficacy of antimicrobial preservation” (Ph. Eur. 5.1.3). To reveal differences in the antimicrobial activity between the various silicone oil emulsions antimicrobial investigations using the gram-negative bacterium *E. coli* 2332 were performed. The Poloxamer 188-stabilized emulsions prepared with the silicone oils M500 as well as M5000 (35% (w/w)) led to a significant reduction of the microbial count. Also the formulation containing the silicone oil M500 and the emulsifier Tween 80 exhibited an explicit bactericidal activity. Hence, the antibacterial effect of silicone oil emulsions depends considerably on the composition of the emulsion (emulsifier, oil phase as well as composition of continuous phase) as well as the oil concentration and the microbial count. Only the emulsions with a high silicone oil concentration displayed an explicit bactericidal effect. Emulsions with low oil concentration (< 10 %) and those containing a low viscous silicone oil (M10) or other pharmaceutical oils (e.g. soy bean oil) stabilized with Poloxamer 188 did not lead to a significant reduction of the microbial count. Moreover, the M500-emulsions stabilized with other emulsifiers (e.g. Cremophor[®] EL; HLB 8.5) displayed no explicit antibacterial activity.

In the microbial as well as in the surface activity studies the impact of silicone oil particle sizes was considered. Emulsions containing larger particles (median > 20 µm) revealed a slightly higher antimicrobial activity and a better surface spreading as compared to emulsions with smaller particles.

Finally, promising silicone oil emulsions were evaluated concerning their therapeutic potential in two experimental colitis models. The positive results of the DSS studies for the commercially available formulation Silfar[®] SE 4 were not reproducible in further investigations. In contrast, the oral therapy of the TNBS induced colitis with diluted silicone oil emulsion (1 % silicone oil M5000/poloxamer 188) was successful and reproducible. When the drinking water of the TNBS-treated mice was replaced by a diluted silicone oil emulsion (ad libitum) the survival rate of the animals in comparison to the control group (drinking water) was increased by about 70 %. A less pronounced therapeutic effect was obtained by administration of M500-emulsion stabilized with HSY 115.

In this work, silicone oil emulsions, systemically varied in their composition, were investigated concerning their technological, surface-chemical and microbiological properties. On the basis of the results obtained emulsions were selected which are potentially suited for the therapy of inflammatory bowel disease. Subsequent animal experiments revealed that particularly the diluted M5000-emulsion stabilized with Poloxamer 188 is highly promising for the therapy of inflammatory bowel diseases.

8 Literatur

1. Preiss P. Siliconöle - ihre Eigenschaften und Applikationsformen. SÖFW Journal 1990;116:175-180.
2. Meier R, Steuerwald M. Review of the therapeutic use of simethicone in gastroenterology. Schweiz Zschr GanzheitsMedizin 2007;19:380-387.
3. Birtley RDN, Burton JS, Kellet DN, Oswald BJ, Pennington JC. The effect of free silica on the mucosal protective and antifatulent properties of polydimethylsiloxane. J Pharm Pharmacol 1973;25:859-863.
4. Bergmann JF, Simoneau G, Chantelair G, Caulin C, Segrestaa JM. Use of dimethicone to reduce the fall in gastric potential difference induced by bile salts. Eur J Clin Pharmacol 1989;36:379-381.
5. Guan YH, de Graaf T, Lath DL, Humphreys SM, Marlow I, Brook AH. Selection of oral microbial adhesion antagonists using biotinylated Streptococcus sanguis and a human mixed oral microflora. Arch Oral Biol 2001;46:129-138.
6. Ellingsen JE, Rolla G. Dental plaque inhibition by a combination of triclosan and polydimethylsiloxane (silicone oil). Scand J Dent Res 1994;102:26-29.
7. Özdamar A, Aras C, Ozturk R, Akin E, Karacorlu M, Ercikan C. In vitro antimicrobial activity of silicone oil against endophthalmitis-causing agents. Retina 1999;19:122-126.
8. Economou-Stamatelopoulou C, Roussopoulos GP, Prouskasa JC, Apostolopoulos M. Antifungal activity of intraocularly used liquids against aspergillus. Ophthalmologica 2004;218:323-327.
9. Ansorg R, von Recklinghausen G, Heintschel von Heinegg E. Susceptibility of Helicobacter pylori to simethicone and other non-antibiotic drugs. J Antimicrob Chemother 1996;37:45-52.
10. Bjarnason I, McPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. Gastroenterology 1995;108:1566-1581.
11. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke M, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M and others. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2002;122:44-54.
12. Kucharzik T. Intestinale Barriere. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2004. Kapitel 2.4, 48-56.
13. Ewaschuk JB, Dieleman LA. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol 2006;12:5941-5950.
14. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics, and prebiotics. Gastroenterology 2004;126:1620-1633.
15. Zoumpopoulou G, Foligne B, Christodoulou K, Grangette C, Pot B, Tsakalidou E. Lactobacillus fermentum ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. Int J Food Microbiol 2008;121:18-26.
16. Baumgart DC. Diagnostik und Therapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Deutsches Ärzteblatt 2009;106:123-133.

17. Stichtenoth DO. Pharmakologie der Substanzgruppen. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2004. Kapitel 4.2, 139-157.
18. Nair B. Final report on the safety assessment of stearoxy dimethicone, dimethicone, methicone, amino bispropyl dimethicone, aminopropyl dimethicone, aminodimethicone, aminodimethicone hydroxystearate, bephenoxy dimethicone, C24-28 alkyl methicone, C30-45 alkyl methicone, C30-45 alkyl dimethicone, cetearyl methicone, cetyl methicone, cetyl dimethicone, dimethoxysilyl ethylenediaminopropyl dimethicone, hexyl methicone, hydroxypropyldimethicone, stearamidopropyl dimethicone, stearyl dimethicone, stearyl methicone, and vinyl dimethicone. *Int J Toxicol* 2003;22:11-35.
19. Noll W. Chemie und Technologie der Silicone: Verlag Chemie Weinheim; 1968. Kapitel 9, 448-457.
20. Noll W. Chemie und Technologie der Silicone: Verlag Chemie Weinheim; 1968. Kapitel 9, 382-386.
21. Eccleston GM. Emulsions and Microemulsions. In: Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Marcel Dekker, New York; 2002. 1066-1085.
22. International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC. Manual of colloid and surface science. Butterworth; 1972.
23. Lagaly G, Schulz O, Zimehl R. Dispersionen und Emulsionen: Steinkopff Verlag, GmbH & Co. KG Darmstadt; 1997. Kapitel 7, 233-273.
24. Frese C. Stabilisierung von (R)-(+)-Limonen in einer Phospholipid Nanoemulsion mittels Hochdruckhomogenisation. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; 2008.
25. Müller RH, Böhm BHL. Dispersion Techniques for Laboratory and Industrial Scale Processing: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2001.
26. Schubert H, Armbruster H. Prinzipien der Herstellung und Stabilität von Emulsionen. *Chem Ing Tech* 1989;61:701-711.
27. Mollet H, Grubenmann A. Formulierungstechnik - Emulsionen, Suspensionen, Feste Formen: Wiley-VCH Weinheim; 2000. Kapitel 2, 77-106.
28. Lagaly G, Schulz O, Zimehl R. Dispersionen und Emulsionen: Steinkopff Verlag, GmbH & Co. KG Darmstadt; 1997. Kapitel 2, 15-67.
29. Lagaly G, Schulz O, Zimehl R. Dispersionen und Emulsionen: Steinkopff Verlag, GmbH & Co. KG Darmstadt; 1997. Kapitel 4, 131-146.
30. Westesen K. Emulsionen. In: Herzfeldt CD, Kreuter J. Grundlagen der Arzneiformenlehre. Galenik 2: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1999. 204-244.
31. Marinova KG, Alargova RG, Denkov ND, Velev OD, Petsev DN, Ivanov IB, Borwankar RP. Charging of oil-water interfaces due to spontaneous adsorption of hydroxyl ions. *Langmuir* 1996;12:2045-2051.
32. Gotchev G, Kolarov T, Khristov K, Exerowa D. On the origin of electrostatic and steric repulsion in oil-in-water emulsion films from PEO-PPO-PEO triblock copolymers. *Colloids and Surfaces A* 2010;354:56-60.

33. Pickering SU. Emulsions. J Chem Soc 1907;91:2001-2021.
34. Wollenweber C, Makievski AV, Miller R, Daniels R. Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability. Colloids and Surfaces A 2000;172:91-101.
35. Voigt R. Pharmazeutische Technologie: Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart; 2006. Kapitel 18, 429-448.
36. Müller RH, Schuhmann R. Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 1996.
37. Braley S. The chemistry and properties of the medical-grade silicones. J Macromol Sci Chem 1970;A4:529-544.
38. Habal MB. The biologic basis for the clinical application of the silicones. Arch Surg 1984;119:843-848.
39. Schwarz R. Die Chemie der Silikone. Die Naturwissenschaften 1947;9:285-288.
40. <http://de.wikipedia.org/wiki/Silikone>. Zugriff am 6.03.2010.
41. Robison R, Kipping FS. Organic derivatives of silicon. Part V. Benzylethylsilicone, dibenzylsilicone, and other benzyl and benzylethyl derivatives of silicane. J Chem Soc, Trans 1908;93:439-456.
42. Kipping FS. Organic derivatives of silicon. Part XV. The nomenclature of organic silicon compounds. J Chem Soc, Trans 1912;101:2106-2107.
43. Steele AR, Kipping FS. Organic derivatives of silicon. Part XXXVII. The production of tetrabenzylsilicane, tribenzylsilicyl oxide, and other products by the action of sodium on dibenzylsilicon dichloride. J Chem Soc 1928:1431-1439.
44. Noll W. Chemie und Technologie der Silicone: Verlag Chemie Weinheim; 1968. Kapitel 2, 24-37.
45. Noll W. Chemie und Technologie der Silicone: Verlag Chemie Weinheim; 1968. Kapitel 9, 393-408.
46. Rochow EG. Einführung in die Chemie der Silikone: Verlag Chemie Weinheim; 1952. Kapitel 6, 90-97.
47. Wacker-Chemie GmbH. Produktinformation - Wacker Siliconöle AK. 2006.
48. Hurd CB. Studies on siloxanes. I. The specific volume and viscosity in relation to temperature and constitution. J Am Chem Soc 1946;68:364-370.
49. Fox HW, Taylor PW, Zisman WA. Polyorganosiloxanes. Surface active properties. Ind Eng Chem 1947;39:1401-1409.
50. Reuther H, Reichel G. Das Verhalten von Silikonölen auf den Oberflächen einiger Metalle und Nichtmetalle. Plaste und Kautschuk 1960;7:171-172.
51. Kommentar zur Ph. Eur. Nachtrag 2000. Monographie "Dimeticon" D41: Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
52. Mundry T. Einbrennsilikonisierung bei pharmazeutischen Glaspackmitteln - Analytische Studien eines Produktionsprozesses. Dissertation. Humboldt-Universität Berlin; 1999.

-
53. Europäisches Arzneibuch, Grundwerk 2008 (Ph.Eur. 6.00). Band 2, Monographie "Dimeticon": Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
 54. United States Pharmacopeia, USP 31/ NF 26. Monographie "Dimethicone"; 2008.
 55. Europäisches Arzneibuch, Grundwerk 2008 (Ph.Eur. 6.00). Band 2, Monographie "Simeticon": Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
 56. United States Pharmacopeia, USP 31. Monographie "Simethicone"; 2008.
 57. Kommentar zur Ph. Eur. 5.0. Monographie "Simeticon": Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
 58. Buist GJ, Burton JS, Elvidge JA. An infrared study of the interaction between Aerosil-200 and polydimethylsiloxane (dimethicone-1000). *J Pharm Pharmacol* 1973;25:854-858.
 59. Rowe VK, Spencer HC, Bass SL. Toxicological studies on certain commercial silicones and hydrolyzable silane intermediates. *J Ind Hyg Toxicol* 1948;30:332-352.
 60. Schaaf F, Gross F. Skin reaction to local application of various substances. *Dermatologica* 1953;106:170-175.
 61. Schaaf F, Gross F. Experimental studies with ointments and bases for ointments. *Dermatologica* 1953;106:357-378.
 62. Andrews JM. Cellular behaviour to injected silicone fluid: A preliminary report. *Plast Reconstr Surg* 1966;38:581-583.
 63. Netzwerk Redaktion. Immunreaktion auf intramuskuläre Injektionen von Silikonöl (PRAVAC). *arznei-telegramm* 1998;6:60.
 64. Wacker Chemie AG. Sicherheitsdatenblatt - Wacker® AK 1000 Siliconöl; 2010.
 65. Kimura KK, Treon JF, Benson FR. Therapeutic use of methylpolysiloxane. *Curr Ther Res Clin Exp* 1964;6:202-216.
 66. Forster C, Jöhr M, Gebbers JO. Fettembolie und Fettembolie-Syndrom. *Schweiz Med Forum* 2002;28:673-678.
 67. Noll W. Chemie und Technologie der Silicone: Verlag Chemie Weinheim; 1968. Kapitel 8, 268-270.
 68. Immel-Sehr A. Luft im Bauch. *Pharmazeutische Zeitung* 2007;39.
 69. Banerjee B, Parker J, Waits W, Davis B. Effectiveness of preprocedure simethicone drink in improving visibilty during esophagogastroduodenoscopy: A double-blind, randomized study. *J Clin Gastroenterol* 1992;15:264-265.
 70. Gladisch R, Elfner R, Massner B, Ulrich H. Premedication for abdominal ultrasound comparison of two commercially available dimethicon preparations. *Ultraschall* 1985;6:114-117.
 71. Bertoni G, Gumina C, Conigliaro R, Ricci E, Staffetti J, Mortilla MG, Pacchione D. Randomized placebo-controlled trial of oral liquid simethicone prior to upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy* 1992;24:268-270.

72. McNally PR, Maydonovitch CL, Wong RKH. The effectiveness of simethicone in improving visibility during colonoscopy: a double-blind randomized study. *Gastrointest Endosc* 1988;34:255-258.
73. Brecevic L, Bosan-Kilibarda I, Strajnar F. Mechanism of antifoaming action of simethicone. *J Appl Toxicol* 1994;14:207-211.
74. Lucassen PLBJ, Assendelft WJJ, Gubbels JW, van Eijk JTM, van Geldrop WJ, Knuistingh Neven A. Effectiveness of treatments for infantile colic: systematic review. *BMJ* 1998;316:1563-1569.
75. Savino F, Palumeri E, Castagno E, Cresi F, Dalmasso P, Cavallo F, Oggero R. Reduction of crying episodes owing to infantile colic: a randomized controlled study on the efficacy of a new infant formula. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:1304-1310.
76. Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R. *Lactobacillus reuteri* (American type culture collection strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: A prospective randomized study. *Pediatrics* 2007;119:e124-e130.
77. Weingärtner U, Petersen-Braun M. Simeticon bei Säuglingskoliken wirksam und verträglich. *Pharmazeutische Zeitung* 2004;28.
78. Sehti KS, Sehti JK. Simethicone in the management of infant colic. *The Practitioner* 1988;232:508.
79. Bernstein JE, Kasich AM. A double-blind trial of simethicone in functional disease of the upper gastrointestinal tract. *J Clin Pharmacol* 1974;14:617-623.
80. Holtmann G, Gschossmann J, Karaus M, Fischer T, Becker B, Mayr P, Gerken G. Randomised double-blind comparison of simethicone with cisapride in functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1459-1465.
81. Holtmann G, Gschossmann J, Mayr P, Talley NJ. A randomized placebo-controlled trial of simethicone and cisapride for the treatment of patients with functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1641-168.
82. Kaplan MA, Prior MJ, Ash RR, McKonly KI, Helzner EC, Nelson EB. Loperamide-simethicone vs loperamide alone, simethicone alone, and placebo in the treatment of acute diarrhea with gas-related abdominal discomfort. *Arch Fam Med* 1999;8:243-248.
83. Connor AL, Wray JC, Wilding IR. A scintigraphic study to investigate the potential for altered gut distribution of loperamide from a loperamide-simethicone formulation in man. *Eur J Pharm Sci* 2001;13:369-374.
84. Weingärtner U, Petersen-Braun M. Kombination von Pankreatin und Simeticon ist wirksam und gut verträglich. *Pharmazeutische Zeitung* 2004;51.
85. Ogilvie AL, Atkinson M. Does dimethicone increase the efficacy of antacids in the treatment of reflux oesophagitis? *J R Soc Med* 1986;79:584-587.
86. Smart HL, Atkinson M. Comparison of dimethicone/antacid (Asilone gel) with an alginate/antacid (Gaviscon liquid) in the management of reflux oesophagitis. *J R Soc Med* 1990;83:554-556.
87. Guneyssel O, Onur O, Denizbasi A, Saritemur M. Carbamazepine overdose after exposure to simethicone: a case report. *JMCR* 2008;2:242-244.

-
88. Caldwell RC, Gallagher A, Liggett RW. Development of coatings for application to teeth. *J Dent Res* 1959;38:197.
 89. Phatak N, Savara BS, Dement J. New silicone compositions in dental practice (A preliminary report). *J Dent Res* 1955;34:788-789.
 90. Rolla G, Gaare D, Ellingsen JE. Experiments with a toothpaste containing triclosan and polydimethylsiloxane. *Scand J Dent Res* 1993;101:130-132.
 91. Kjaerheim V, Waaler SM. Experiments with triclosan-containing mouthrinses: Dose response and an attempt to locate the receptor site(S) of triclosan in the mouth. *Adv Dent Res* 1994;8:302-306.
 92. Waaler SM, Rolla G, Skjörland K, Ögaard B. Effect of oral rinsing with triclosan and sodium lauryl sulphate on dental plaque inhibition: A pilot study. *Scand J Dent Res* 1993;101:192-195.
 93. Rykke M, Rolla G. Effect of silicone oil on protein adsorption to hydroxyapatite in vitro on pellicle formation in vivo. *Scand J Dent Res* 1990;98:401-411.
 94. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Arends J, Darius PL, Steenberghe van D. The influence of surface free-energy on planimetric plaque growth in man. *J Dent Res* 1989;68:796-799.
 95. Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ. The effects of pellicle formation on streptococcal adhesion to human enamel and artificial substrata with various surface free-energies. *J Dent Res* 1989;68:463-467.
 96. Liu Y, Zhao Q. Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. *Biophys Chem* 2005;117:39-45.
 97. Szurman P, Bartz-Schmidt KU. Silikonöl in der Netzhautchirurgie. *Ophthalmologe* 2000;97:514-525.
 98. Gabel VP, Kampik A, Burkhardt J. Analysis of intraocularly applied silicone oils of various origins. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987;225:160-162.
 99. Failer J, Faulborn J, Erb P. Die Phagozytose von Silikonölen unterschiedlicher Viskosität durch Peritoneal-Makrophagen der Maus. *Klin Mbl Augenheilk* 1984;184:450-452.
 100. Champion R, Faulborn J, Bowald S, Erb P. Peritoneal reaction to liquid silicone: an experimental study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987;225:141-145.
 101. Savion N, Alhalel A, Treister G, Bartov E. Role of blood components in ocular silicone oil emulsification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:2694-2699.
 102. Best S, Vernon S. Silicone oil glaucoma. *J Glaucoma* 2001;10:51-54.
 103. Gedde SJ. Management of glaucoma after retinal detachment surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2002;13:103-109.
 104. Borislav D. Cataract after silicone oil implantation. *Doc Ophthalmol* 1993;83:79-82.
 105. Foulks GN, Hatchell DL, Proia AD, Klintworth GK. Histopathology of silicone oil keratopathy in humans. *Cornea* 1991;10:29-37.
 106. Engelmann K, Herbrig E. Indikation zum Einsatz verschiedener Endotamponaden. *Klin Mbl Augenheilkd* 2008;225:138-145.

107. Joussen AM, Wong D. The concept of heavy tamponades - chances and limitations. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246:1217-1224.
108. Aras C, Özdamar A, Karacorlu M, Ozkan S. Silicone oil in the surgical treatment of endophthalmitis associated with retinal detachment. *Int Ophthalmol* 2002;24:147-150.
109. Driver DS. Perineal dermatitis in critical care patients. *Crit Care Nurse* 2007;27:42-26.
110. Fowler JF. Efficacy of a skin-protective foam in the treatment of chronic hand dermatitis. *Am J Contact Dermatitis* 2000;11:165-169.
111. Wulff C, Haeberlein S, Haas W. Cream formulations protecting against cercarial dermatitis by *Trichobilharzia*. *Parasitol Res* 2007;101:91-97.
112. Ingram RJ, Bartlett A, Brown MB, Marriott C, Whitfield PJ. Dimethicone barrier cream prevents infection of human skin by schistosome cercariae: Evidence from franz cell studies. *J Parasitol* 2002;88:399-402.
113. Leinmüller R. Neues Pedikulozid lässt Kopfläuse ersticken. *Deutsches Ärzteblatt* 2007;104:A2218.
114. Burgess IF, Brown CM, Lee PN. Treatment of head louse infestation with 4% dimeticone lotion: randomised controlled equivalence trial. *BMJ* 2005;330:1423-1426.
115. Burgess IF, Lee PN, Matlock G. Randomised, controlled, assessor blind trial comparing 4% dimeticone lotion with 0.5% malathion liquid for head louse infestation. *PLoS ONE* 2007;2:e1127.
116. Heukelbach J, Pilger D, Oliveira FA, Khakban A, Ariza L, Feldmeier H. A highly efficacious pediculicide based on dimethicone: Randomized observer blinded comparative trial. *BMC Infect Dis* 2008;8:115-124.
117. Martin E. Bei Kopfläusen frühzeitig und konsequent handeln. *Pharmazeutische Zeitung* 2007;20.
118. Thomas X. <http://www.dowcorning.com/content/publishedlit/Chapter17.pdf>. Zugriff am 8.03.2010.
119. Korpela MT, Järvi K. Comparison of urethral reaction to full silicone, hydrogen-coated and siliconised latex catheters. *Br J Uro* 1990;66:652-657.
120. <http://kompetenznetz-ced.de>. Zugriff am 8.03.2010.
121. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504-1517.
122. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369:1627-1640.
123. Ott C, Obermeier F, Thielers S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G, Timmer A. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:917-923.
124. Timmer A. Epidemiologie der CED. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2004. Kapitel 2.1, 8-21.

-
125. Meier R. Alarm im Darm - Chronisch entzündliche Darmerkrankungen - Pathogenese und Möglichkeiten der Ernährungstherapie. *Aktuel Ernaehr Med* 2008;33:39-43.
 126. MacDonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005;307:1920-1925.
 127. Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;38:738-741.
 128. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Eng J Med* 1991;324:84-88.
 129. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996;312:95-96.
 130. Hugot JP, Zouali H, Lesage S, Thomas G. Etiology of the inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 1999;14:2-9.
 131. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M and others. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
 132. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJP, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M and others. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359:1661-1665.
 133. Schreiber S. Genetik der CED. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2004. Kapitel 2.2, 22-27.
 134. Meier R. Der Darm als Immunorgan - Die Bedeutung der Darmflora für die Gesundheit. *SZE* 2008;1:17-20.
 135. Eckmann L. Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20:82-88.
 136. Neish AS, Gewirtz AZ, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I kappa B-alpha ubiquitination. *Science* 2000;289:1560-1563.
 137. Delves PJ, Roitt IM. The immune system - First of two parts. *N Eng J Med* 2000;343:37-49.
 138. Mowat AMCI. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:331-341.
 139. Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996;26:934-938.
 140. Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR. A role for TNF- α and mucosal T helper4 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997;159:6276-6282.
 141. O'Neill LAJ. How NOD-ing off leads to Crohn disease. *Nat Immunol* 2004;5:776-778.
 142. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999;116:301-309.

143. Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: Characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology* 2001;121:1320-1328.
144. Sartor RB. Induction of mucosal immune responses by bacteria and bacterial components. *Curr Opin Gastroenterol* 2001;17:555-561.
145. Liévin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000;47:646-652.
146. Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:370-378.
147. Gersemann M, Wehkamp J, Fellermann K, Stange EF. Crohn's disease-defect in innate defence. *World J Gastroenterol* 2008;14:5499-5503.
148. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-274.
149. Dianda L, Hanby AM, Wright NA, Sebesteny A, Hayday AC, Owen MJ. T cell receptor- $\alpha\beta$ -deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol* 1997;150:91-97.
150. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002;20:459-549.
151. Schultzs C, Van Den Berg FM, Kate FWT, Tytgat GN, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 1999;117:1089-1097.
152. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405-1413.
153. Engstrand L. *Mycobacterium paratuberculosis* and Crohn's disease. *Scand J Infect Dis* 1995;989:27-29.
154. Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, Fuchs D, Jahn HK, Freudenberg M, Loddenkemper C, Batra A and others. Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS ONE* 2007;2:e662.
155. Otte JM, Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G613-G626.
156. Reinshagen M. Klinik des Morbus Crohn. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*: Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2004. Kapitel 3.1, 58-71.
157. Rao SS, Holdsworth CD, Read NW. Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1988;29:342-345.
158. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, Gendre JP. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000;8:244-250.
159. Gan SI, Beck PL. A new look at toxic megacolon: An update and review of incidence, etiology, pathogenesis, and management. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2363-2371.

160. Zisman TL, Rubin DT. Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:2662-2669.
161. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: A population-based study. *Cancer* 2001;91:854-862.
162. Rogler G, Schölmerich J. Extraintestinale Manifestationen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Med Klin* 2004;99:123-130.
163. Tromm A, May D, Almus E, Voigt E, Greving I, Schwegler U, Griga T. Cutaneous manifestations in inflammatory bowel disease. *Z Gastroenterol* 2001;39:137-144.
164. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369:1641-1657.
165. Kleer CG, Appelman HD. Ulcerative colitis: Patterns of involvement in colorectal biopsies and changes with time. *Am J Surg Pathol* 1998;22:983-989.
166. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009;136:1182-1197.
167. Schultz M, Strauch UG, Linde HJ, Watzl S, Obermeier F, Göttl C, Dunger N, Grunwald N, Schölmerich J, Rath HC. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:372-378.
168. Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M and others. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53:1617-1623.
169. Zocco MA, Zileri Dal Verme L, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V and others. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1567-1574.
170. Osman N, Adawi D, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Dig Dis Sci* 2004;49:320-327.
171. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2578-2588.
172. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999;276:941-950.
173. Lammers KM, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A, Caramelli E, Kamm MA, Brigidi P, Gionchetti P, Campieri M. Effect of probiotic strains on Interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1182-1186.
174. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001;121:580-591.
175. Fernández-Banares F, Hinojosa J, Sánchez-Lombrana JL, Navarro E, Martínez-Salmerón JF, García-Pugés A, González-Huix F, Riera J, González-Lara V, Domínguez-Abascal F and

- others. Randomized clinical trial of plantago ovata seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:427-433.
176. Okada Y, Tsuzuki Y, Miyazaki J, Matsuzaki K, Hokari R, Komoto S, Kato S, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K and others. Propionibacterium freudenreichii component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing. *Gut* 2006;55:681-688.
 177. Marteau P, Seksik P, Shanahan F. Manipulation of the bacterial flora in inflammatory disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:47-61.
 178. Guslandi M. Antibiotics for inflammatory bowel disease: do they work? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:145-147.
 179. Seibold F, Egger B, Göke B. Neues von der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Was haben wir von Kolitis-Tiermodellen gelernt? *Schweiz Med Wochenschr* 2000;130:749-755.
 180. Wirtz S, Neurath M. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2000;15:144-160.
 181. Holtmann M, Neurath MF. Das intestinale Immunsystem. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Georg Thieme Verlag Stuttgart; 2004. Kapitel 2.3, 43-44.
 182. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.
 183. Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* 1996;39:234-241.
 184. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicpathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993;69:238-249.
 185. Guarner F, Malagelada JR. Role of bacteria in experimental colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:793-804.
 186. Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Kita M, Ueda Y, Iwakura Y and others. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin Exp Immunol* 2006;146:330-338.
 187. Murthy SNS, Cooper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA, Sedergran DJ. Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci* 1993;38:1722-1734.
 188. Melgar S, Karlsson L, Rehnström E, Karlsson A, Utkovic H, Jansson L, Michaëlsson E. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol* 2008;8:836-844.
 189. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109:1344-1367.

190. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96:795-803.
191. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* 2007;2:541-546.
192. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 2000;19:51-62.
193. Neurath M, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. Antibodies to Interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182:1281-1290.
194. Ebach DR, Newberry R, Stenson WF. Differential role of Tumor Necrosis Factor receptors in TNBS colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:533-540.
195. Cheng H, Xia B, Guo Q, Zhang L, Wang F, Jiang L, Wang Z, Zhang Y, Li C. Sinomenine attenuates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Int Immunopharmacol* 2007;7:604-611.
196. Voigt R. *Pharmazeutische Technologie*: Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart; 2006. Kapitel 5, 156-167.
197. Fiedler HP. *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete*: Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH Aulendorf; 2002.
198. Nielloud F, Marti-Mestres G. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*. Lucks, J S, Müller, BW, Klütsch, K. Chapter 6: Parenteral fat emulsions: Structure, stability, and applications: Marcel Dekker, Inc, New York; 2000. 229-257.
199. Westesen K, Bunjes H. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room-temperature always possess a solid lipid matrix. *Int J Pharm* 1995;115:129-131.
200. Bauer KH, Frömming KH, Führer C. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2006. Kapitel 6, 182-187.
201. Shin Etsu Chemical Co. Ltd. *Metolose. Water-Soluble Cellulose Ethers*. Produktbroschüre. Tokyo; 2006.
202. Voigt R. *Pharmazeutische Technologie*: Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart; 2006. Kapitel 5, 147-152.
203. Small DM, Hanahan DJ. *Handbook of lipid research 4, The physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids*: Plenum Press, New York; 1988.
204. Wacker Chemie AG. *Datenblatt - Wacker Belsil® DMC 6031*; 2004.
205. Kutz G, Hennig S, Rac D, Scheppler P. PEG/PPG- 25/25 Dimethicone: Was leistet es? *SÖFW Journal* 2004;130:35-44.
206. *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch. Grundwerk mit 30. Aktualisierungslieferung. Monographie "Polysorbat 80"*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2008.
207. *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch. Grundwerk mit 30. Aktualisierungslieferung. Monographie "Sorbitanmonolaurat"*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2008.
208. Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation. *Ryoto® Sugar Ester - Technical Information*; 2001.

-
209. Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J, Schulz V. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2007.
210. Europäisches Arzneibuch Grundwerk 2008 (Ph. Eur. 6.00). Band 1, Monographie 5.1.3 "Prüfung auf ausreichende Konservierung": Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
211. Europäisches Arzneibuch Grundwerk 2008 (Ph. Eur. 6.00). Band 1, 4.1.1 Reagenzien: Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
212. Urban K, Wagner G, Schaffner D, Röglin D, Ulrich J. Rotor-stator and disc systems for emulsification processes. *Chem Eng Technol* 2006;25:24-31.
213. Naini V, Singh SK. Homogenization and Homogenizers. In: Swarbrick J, Boylan JC. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*: Marcel Dekker, New York; 2002. 1479-1487.
214. Müller RH, Schuhmann R. Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 1996. Kapitel 4, 55-99.
215. Keck CM, Müller RH. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry-90% of the published measurements are false. *Int J Pharm* 2008;355:150-163.
216. Xu R. Improvements in particle size analysis using light scattering. In: Müller RH, Mehnert W. (Ed.) *Particle and Surface Characterizing Methods*: Scientific Publishers Stuttgart; 1997. Chapter 3, 27-56.
217. Mayrhofer A. Refraktometrie. *Fresenius J Anal Chem* 1933;95:66-68.
218. Caesar & Loretz GmbH. Analysenzertifikat Extern Oleum Sojae raffinatum. Charge 070589. 2007.
219. Caesar & Loretz GmbH. Analysenzertifikat Extern Miglyol® 812. Charge 061789. 2006.
220. PSS Particle Sizing Systems. www.pssnicomp.com. Zugriff am 20.03.2010.
221. Gonyon T, Patel P, Owen H, Dunham AJ, Carter PW. Physicochemical stability of lipid injectable emulsions: Correlating changes in large globule distributions with phase separation behavior. *Int J Pharm* 2007;343:208-219.
222. PSS Particle Sizing Systems, Santa Barbara. AccuSizer SIS User Manual; 2003.
223. Haskell RJ. Characterization of Submicron Systems via Optical Methods. *J Pharm Sci* 1998;87:125-129.
224. Haskell RJ, Shifflet JR, Elzinga PA. Particle sizing technologies for submicron emulsions. In: *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*: Harwood academic publishers Amsterdam; 1998. Chapter 3, 21-98.
225. Oberle H. Untersuchung der mikropartikulären Fraktion in kolloidalen Lipiddispersionen mit Hilfe von SPOS (Single Particle Optical Sensing). Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena; 2006.
226. Müller RH, Schuhmann R. Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 1996. Kapitel 3, 23-53.
227. Jumaa M, Müller BW. The stabilization of parenteral fat emulsion using non-ionic ABA copolymer surfactant. *Int J Pharm* 1998;174:29-37.

-
228. Dörfler HD. Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Springer Verlag Berlin; 2002. Kapitel 3, 53-55.
229. Voigt R. Pharmazeutische Technologie: Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart; 2006. Kapitel 2, 87-96.
230. Böttcher H. Funktionelle Beschichtung auf Basis anorganischer Nanosole. Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2001;32:759-766.
231. Frant M, Stenstad P, Johnsen H, Dölling K, Rothe U, Schmid R, Liefelth K. Anti-infective surfaces based on tetraether lipids for peritoneal dialysis catheter systems. Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2006;37:538-545.
232. Raman CV, Krishnan KS. A new type of secondary radiation. Nature 1928;121:501-502.
233. Schrader B. Infrared and Raman Spectroscopy: VCH; 1995. Kapitel 3.5, 135-161; Kapitel 4.1, 189-222.
234. Uhlemann U. Untersuchung von Metallkomplexen und metallaktivierten Reaktionen durch schwingungsspektroskopische Methoden. Kapitel 3.1.1. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena; 2008.
235. Yao J, Rastetter G. Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography. Analytical Biochemistry 1985;150:111-116.
236. Bast E. Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 2001. Kapitel 6, 163-168.
237. Saupe S. Konservierung flüssiger Zubereitungen zur oralen Einnahme. Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena; 2006.
238. Sachse A, Göritz D, Hilse M; Wässrige Emulsion, enthaltend ein Organopolysiloxan und ein nichtionisches Tensid, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie Verwendung der Emulsion. Patent DE 103 26 188 A1. Deutschland. 2004.
239. Schultz S, Wagner G, Ulrich J. Hochdruckhomogenisierung als ein Verfahren zur Emulsionsherstellung. Chem Ing Tech 2002;74:901-909.
240. Karbstein H, Schubert H. Einflussparameter auf die Auswahl einer Maschine zum Erzeugen feindisperser O/W-Emulsionen. Chem Ing Tech 1995;67:616-619.
241. Desrumaux A, Marcand J. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high pressure homogenization (up to 350MPa): effect of pressure on emulsion characteristics. Int J Food Sci 2002;37:263-269.
242. Walstra P. Principles of emulsion formulation. Chem Engng Sci 1993;48:333-349.
243. Bock TK, Lucks JS, Kleinebudde P, Müller RH, Müller BW. High pressure homogenisation of parenteral fat emulsions - influence of process parameters on emulsion quality. Eur J Pharm Biopharm 1994;40:157-160.
244. Pandolfe WD. Effect of premix condition, surfactant concentration, and oil level on the formation of oil-in-water emulsions, by homogenization. J Dispers Sci Technol 1995;16:633-650.

245. Jahnke S. The theory of high-pressure homogenization. In: Müller RH, Böhm BHL. Dispersion techniques for laboratory and industrial scale processing: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2001. Chapter 1, 7-30.
246. Pandolfe WD. Effect of dispersed and continuous phase viscosity on droplet size of emulsions generated by homogenization. *J Dispers Sci Technol* 1981;2:459-474.
247. Arai K, Konno M, Matunaga Y, Saito S. Effect of dispersed-phase viscosity on the maximum stable drop size for breakup in turbulent flow. *J Chem Eng Jap* 1977;10:325-330.
248. Kawaguchi M, Kubota K. Rheo-optical properties of silicone oil emulsions in the presence of polymer emulsifiers. *Langmuir* 2004;20:1126-1129.
249. Jelinek A, Klöcking HP. In vitro toxicity of surfactants in U937 cells: cell membrane integrity and mitochondrial function. *Exp Toxicol Pathol* 1998;50:472-476.
250. Jelinek A. In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2001.
251. Tsui HW, Hsu YH, Wang JH, Chen LJ. Novel behavior of heat of micellization of Pluronics F68 and F88 in aqueous solutions. *Langmuir* 2008;24:13858-13862.
252. Westesen K, Wehler T. Physicochemical characterization of a model intravenous oil-in-water emulsion. *J Pharm Sci* 1992;81:777-786.
253. Férézou J, Gulik A, Domingo N, Milliat F, Dedieu JC, Dunel-Erb S, Chevalier C, Bach AC. Intralipid 10%: Physicochemical Characterization. *Nutrition* 2001;17:930-933.
254. Marszall L. The determination of the required HLB of emulsions by an emulsion inversion point. *Rivista italiana essenze, profumi, piante officinali, aromi, saponi, cosmetici, aerosol*;62:113-116.
255. Yamaguchi T, Nishizaki K, Itai S, Hayashi H, Ohshima H. Physicochemical characterization of parenteral lipid emulsion: Influence of cosurfactants on flocculation and coalescence. *Pharm Res* 1995;12:1273-1278.
256. Christiansen C, Müller BW. Cloud point/ cloud temperature - measurement methods for surfactant characterization. *Pharm Ind* 2002;64:278-282.
257. Voigt R. Pharmazeutische Technologie: Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart; 2006. Kapitel 2, 79-81.
258. Heusch R. Hydratkomplexe in wäßrigen Tensidsystemen. *Naturwissenschaften* 1992;79:450-456.
259. Boyd J, Parkinson C, Sherman P. Factors affecting emulsion stability, and the HLB concept. *J Colloid Interface Sci* 1971;41:359-370.
260. Bahadur P, Li P, Almgren M, Brown W. Effect of potassium fluoride on the micellar behavior of Pluronic F-68 in aqueous solution. *Langmuir* 1992;8:1903-1907.
261. Wu YL, Sprik R, Poon WCK, Eiser E. Effect of salt on the phase behaviour of F68 triblock PEO/PPO/PEO copolymer. *J. Phys.: Condens. Matter* 2006;18:4461-4470.

-
262. Driscoll D, Etzler F, Barber TA, Nehne J, Niemann W, Bistran BR. Physicochemical assessments of parenteral lipid emulsions: light obscuration versus laser diffraction. *Int J Pharm* 2001;219:21-37.
263. Schulz MB, Daniels R. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;49:231-236.
264. Daniels R, Rimpler S. Effect of heat sterilization on the stability of o/w emulsions containing hydroxypropyl methyl cellulose as emulsifier. *Pharmaceut Pharmacol Lett* 1993;3:80-83.
265. Yonekura K, Hayakawa K, Kawaguchi M, Kato T. Preparation of stable silicone oil emulsions in the presence of hydroxypropyl methyl cellulose. *Langmuir* 1998;14:3145-3148.
266. Pfizer Pharma GmbH. Gebrauchsinformation - sab simplex®. Mai 2005.
267. Holley W. Emulgieren, Homogenisieren, Grenzflächenvergrößerung. In: Asche H, Essig D, Schmidt PC. *Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*; 1984. Kapitel V, 89-101.
268. Shinoda K, Arai H. The correlation between phase inversion temperature in emulsion and cloud point in solution of nonionic emulsifier. *J Phys Chem* 1964;68:3485-3490.
269. Shinoda K, Saito H. The stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method. *J Colloid Interface Sci* 1969;30:258-263.
270. Zimmermann E, Müller RH. Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur J Pharm Biopharm* 2001;52:203-210.
271. Heusch R. Elementarprozesse bei der Herstellung und Stabilisierung von Emulsionen. *Chem Ing Tech* 1983;55:608-616.
272. Riddick TM. *Control of colloid stability through zeta potential*. New York: Zeta Meter; 1968.
273. Becher P, Schick MJ. *Nonionic Surfactants*: Marcel Dekker New York; 1987. 435.
274. Müller RH, Schuhmann R. *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*; 1996. Kapitel 5, 116-118.
275. Washington C, Chawla A, Christy N, Davis SS. The electrokinetic properties of phospholipid-stabilized fat emulsions. *Int J Pharm* 1989;54:191-197.
276. Hornig S, Heinze T. Efficient approach to design stable water-dispersible nanoparticles of hydrophobic cellulose esters. *Biomacromolecules* 2008;9:1487-1492.
277. Hornig S, Bunjes H, Heinze T. Preparation and characterization of nanoparticles based on dextran-drug conjugates. *J Colloid Interface Sci* 2009;338:56-62.
278. Jovtscheff A, Popoff A, Micev I, Spassov S. Papierchromatographische Trennung kritischer Paare von Fettsäuren durch Brom-Methoxylierung. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 1963;11:913-915.
279. Jayes L, Hard AP, Sene C, Parker SF, Jayasooriya UA. Vibrational spectroscopic analysis of silicones: A Fourier transform-Raman and inelastic neutron scattering investigation. *Anal Chem* 2003;75:742-746.

-
280. Erckens RJ, Hosseini K, March WF, Jongsma FHM, Wicksted JP, Li HK, Hendrikse F. Raman spectroscopy: Noninvasive determination of silicone oil in the eye: Potential applications for intraocular determination of biomaterials. *Retina* 2002;22:796-799.
281. Dokic PP, Dokic JP, Sovilj VJ, Katona JM. Influence of maltodextrin dextrose equivalent value on rheological and dispersion properties of sunflower oil in water emulsions. *Acta periodica technologica* 2004;35:17-24.
282. Tesch S, Freudig B, Schubert H. Herstellen von Emulsionen in Hochdruckhomogenisatoren - Teil 1: Zerkleinern und Stabilisieren von Tropfen. *Chem Ing Tech* 2002;74:875-880.
283. Tesch S, Schubert H. Influence of increasing viscosity of the aqueous phase on the short-term stability of protein stabilized emulsions. *J Food Eng* 2002;52:305-312.
284. Seekkuarachchi IN, Tanaka K, Kumazawa H. Formation and characterization of submicrometer oil-in-water (o/w) emulsions, using high-energy emulsification. *Ind Eng Chem Res* 2006;45:372-390.
285. Pingoud A, Urbanke C. Arbeitsmethoden der Biochemie: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin; 1997. Kapitel 3, 57-62.
286. Kessel D. Properties of Cremophor EL micelles probed by fluorescence. *Photochem Photobiol.* 1992;56:447-451.
287. Greulich M. Einfluss von Tensiden auf die Resorption von Substraten der ABC-Transportproteine. Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; 2003.
288. Kuntsche J. Unterkühlt-Smektsische Lipid-Nanopartikel: Entwicklung und Charakterisierung eines neuartigen Trägersystems für schwer wasserlösliche Arzneistoffe. Kapitel 4.7. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena; 2006.
289. Kato A, Arima K. Inhibitory effect of sucrose ester of lauric acid on the growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;42:596-601.
290. Marshall DL, Bullerman LB. Antimicrobial activity of sucrose fatty acid ester emulsifiers. *J Food Science* 1986;51:468-470.
291. Stratford M, Eklund T. Organic acids and esters. In: Russell NJ, Gould GW. *Food preservatives*: Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York; 2003. Kapitel 4, 48-76.
292. <http://www.biologischer-lehrpfad.de/seminare/mikrobio/Zellwandaufbau%20grampositiv%20gramnegativ.pdf>. Zugriff am 20.03.2010.
293. Sahl HG. Aufbau und Morphologie der Bakterienzelle. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. *Medizinische Mikrobiologie*: Urban & Fischer Verlag München, Jena; 2001. Kapitel 3.1, 156-171.
294. Kothe E. Pilze. In: Fuchs G, Schlegel HG. *Allgemeine Mikrobiologie*: Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 2007. Kapitel 3, 66-72.
295. Munk K. *Mikrobiologie*: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin; 2001. Kapitel 5, 5-1 bis 5-24.
296. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;127:412-421.

-
297. Schuppler M, Löttsch K, Waidmann M, Autenrieth IB. An abundance of *Escherichia coli* is harbored by the mucosa-associated bacterial flora of Interleukin-2-deficient mice. *Infect Immun* 2004;72:1983-1990.
298. http://www.zct-berlin.de/klinik.praxis/Escherichia_coli.html - Wichtige Erreger in Klinik und Praxis - *Escherichia coli*. Zugriff am 20.03.2010.
299. Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 2000;6:205-214.
300. Herman EB, Haas GJ, Crosby WH, Cante CJ. Antimicrobial action of short chain alcohols and glycols. *J Food Saf* 1980;2:131-139.
301. Hamouda T, Baker JR. Antimicrobial mechanism of action of surfactant preparations in enteric Gram-negative bacilli. *J Appl Microbiol* 2000;89:397-403.
302. Hamouda T, Myc A, Donovan B, Shih AY, Reuter JD, Baker JR. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiol Res* 2001;156:1-7.
303. Weingarten C, Magalhaes NSS, Baszkin A, Benita S, Seiller M. Interactions of a non-ionic ABA copolymer surfactant with phospholipid monolayers: Possible relevance to emulsion stabilization. *Int J Pharm* 1991;75:171-179.
304. Chang LC, Lin CY, Kuo MW, Gau CS. Interactions of pluronics with phospholipid monolayers at the air-water interface. *J Colloid Interface Sci* 2005;285:640-652.
305. Venne A, Li S, Mandeville R, Kabanov A, Alakhov V. Hypersensitizing effect of Pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Res* 1996;56:3626-3629.
306. Levy ML, Luu T, Meltzer HS, Bennett R, Bruce DA. Bacterial adhesion to surfactant-modified silicone surfaces. *Neurosurgery* 2004;54:488-491.
307. Treude A. Bedeutung der EP-Rezeptoren in der Pathogenese des antenatalen Bartter-Syndroms/Hyperprostaglandin-E-Syndroms und ihre Funktion in der renalen Elektrolytregulation. Dissertation. Philipps-Universität Marburg; 2007.
308. Beinhorn K. Funktion der Cyclooxygenaseisoformen an einem Tiermodell des Hyperprostaglandin-E2-Syndroms/antenatalen Barttersyndroms. Dissertation. Philipps-Universität Marburg; 2005.
309. Siegmund B, Rieder F, Albrich S, Wolf K, Bildingmaier C, Firestein GS, Boyle D, Lehr HA, Loher F, Hartmann G and others. Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;296:99-105.
310. Rieder F. Wirkung der spezifischen Phosphodiesterase-Inhibitoren Roflumilast und Pumafentrine im Mausmodell der Dextran-Natrium-Sulfat-induzierten Kolitis. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München; 2004.
311. Adolph M. Lipid emulsions in parenteral nutrition. *Ann Nutr Metab* 1999;43:1-13.
312. Marino PL. Das ICU-Buch: Elsevier GmbH München; 2008. Sektion II, 49-62.
313. Fischer K. Kolienterotoxämie und experimentelle *E. coli*-Endotoxinwirkung beim Absetzferkel unter besonderer Berücksichtigung von immunologischen, pharmakologisch-toxikologischen,

- pathophysiologischen, pathobiochemischen, Blut- und Gerinnungsparametern sowie Verfahren zur Bekämpfung der Aufzuchtkrankheit Kolienterotoxikämie bei industriemäßigen Haltungsbedingungen. Dissertation. Institut für Impfstoffe Dessau, Akademie der Landwirtschaftswissenschaften der Deutschen Demokratischen Republik; 1982.
314. Kociok N, Gavranic C, Kirchhof B, Joussen AM. Influence on membrane-mediated cell activation by vesicles of silicone oil or perfluorohexyloctane. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:345-358.
315. Asche Chiesi GmbH. Fachinformation - Elugan[®] Tropfen. Oktober 2002.
316. Berlin-Chemie AG. Fachinformation - Espumisan[®] Emulsion. März 2004.
317. Bayer Vital GmbH. Fachinformation - Lefax[®] Pump-Liquid. Januar 2003.
318. Wacker-Chemie GmbH. Produktinformation - Silfar[®] SE4. September 2000.

A Anhang

A1 Autoklavier- und Lagerstabilität der Emulsionen

Die Siliconölemulsionen (35 % Siliconöl, 2 % Emulgator → Ausnahmen: Phospholipid S100 4,2 %, HPMC 0,5 %) wurden mittels Hochdruckhomogenisation (700 bar, 10 Zyklen) bei Raumtemperatur hergestellt und mittels Laserdiffraktometrie charakterisiert. Die Lagerung der autoklavierten (nA) und nicht autoklavierten (vA) Proben erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur.

Tab. A1-1: Zusammenfassung der Lager- und Autoklavierstabilität der untersuchten Emulsionen (vA-vor dem Autoklavieren, nA-nach dem Autoklavieren)

	M10				M100				M500				M1000			
	D50 [µm]		D99 [µm]		D50 [µm]		D99 [µm]		D50 [µm]		D99 [µm]		D50 [µm]		D99 [µm]	
	vA	nA	vA	nA	vA	nA	vA	nA	vA	nA	vA	nA	vA	nA	vA	nA
Cremophor® EL																
Herstellung	0,34	0,66	0,55	2,05	0,54	0,51	2,10	1,99	1,21	1,29	3,17	3,02	1,76	1,74	5,58	5,58
4 W	–	0,61	–	1,94	–	0,52	–	2,00	–	1,25	–	3,13	–	1,74	–	5,21
8 W	–	0,67	–	1,97	–	0,52	–	2,00	–	1,25	–	3,16	–	1,74	–	5,52
12 W	–	0,64	–	2,04	–	0,52	–	1,99	–	1,22	–	2,97	–	1,69	–	5,69
24 W	0,34	0,65	0,56	2,11	0,51	0,52	1,98	1,96	1,21	1,23	3,00	3,20	1,72	1,74	5,96	5,71
52 W	0,46	0,63	24,05	2,13	0,51	0,53	1,99	1,98	1,24	1,22	3,18	3,05	1,75	1,72	5,45	5,56
Tween® 80																
Herstellung	0,31	0,36	0,54	0,59	0,49	0,49	1,82	1,81	1,22	1,23	3,02	2,99	2,30	2,24	5,69	6,04
4 W	–	0,36	–	0,59	–	0,49	–	1,81	–	1,22	–	2,92	–	2,19	–	6,04
8 W	–	0,36	–	0,59	–	0,49	–	1,82	–	1,23	–	3,01	–	2,25	–	5,63
12 W	–	0,35	–	0,59	–	0,48	–	1,83	–	1,21	–	2,00	–	2,33	–	5,84
24 W	0,31	0,36	0,54	0,59	0,49	0,49	1,81	1,84	1,22	1,21	2,92	2,95	2,19	2,24	5,73	5,74
52 W	0,32	0,37	0,56	0,60	0,48	0,49	1,81	1,82	1,22	1,23	2,92	2,97	2,22	2,27	5,84	5,77
HLB 8,5 (Span® 80/Tween® 80)																
Herstellung	0,36	0,35	0,55	0,55	0,57	0,57	1,96	1,96	2,27	2,29	5,48	5,41	3,62	3,64	7,96	7,79
4 W	–	0,35	–	0,55	–	0,56	–	1,97	–	2,29	–	5,51	–	3,67	–	7,98
8 W	–	0,35	–	0,55	–	0,56	–	1,93	–	2,29	–	5,49	–	3,66	–	8,00
12 W	–	0,35	–	0,55	–	0,55	–	1,87	–	2,30	–	5,57	–	3,65	–	8,01
24 W	–	0,35	–	0,55	–	0,56	–	1,96	–	2,24	–	5,52	–	3,54	–	7,89
52 W	0,35	0,36	0,56	0,56	0,56	0,56	1,96	1,95	2,25	2,23	5,34	5,39	3,61	3,58	7,78	7,78

W = Wochen, PT = Phasentrennung, PW = Pilzwachstum; – keine Messwerte vorhanden

Fortsetzung Tab. A1-1

	M10				M500			
	D50 [µm]		D99 [µm]		D50 [µm]		D99 [µm]	
	vA	nA	vA	nA	vA	nA	vA	nA
Phospholipid S100								
Herstellung	0,16	0,16	0,41	0,41	2,02	2,05	5,80	5,65
4 W	–	0,16	–	0,41	–	2,05	–	5,84
8 W	–	0,16	–	0,40	–	2,04	–	5,99
12 W	–	0,16	–	0,41	–	2,05	–	5,95
24 W	0,16	0,16	0,40	0,40	2,03	2,01	5,97	5,86
52W	0,16	0,16	0,41	0,41	2,03	2,00	5,82	5,92
Poloxamer 188								
Herstellung	0,27	0,34	0,53	0,54	1,11	1,11	4,50	4,85
4 W	–	0,34	–	0,54	–	1,13	–	7,71
8 W	–	0,34	–	0,55	–	1,10	–	4,42
12 W	–	0,34	–	0,55	–	1,11	–	4,55
24 W	0,27	0,34	0,53	0,54	1,14	1,11	4,39	4,98
52W	0,27	0,34	0,53	0,55	1,05	1,08	4,78	4,62
Span® 80								
Herstellung	0,46	0,46	0,71	0,72	5,58	5,96	11,79	47,25
4 W	–	0,62	–	9,20	Phasentrennung (PT)			
8 W	–	0,87	–	20,19				
12 W	0,46	PT	0,72	PT				
24 W	9,09	–	93,70	–				
52W	PT	–	PT	–				
Wacker Belsil® DMC 6031								
Herstellung	2,21	2,22	6,29	6,13	7,18	7,14	20,79	19,92
4 W	–	2,20	–	6,65	–	7,25	–	24,63
8 W	–	2,25	–	6,64	–	7,19	–	25,57
12 W	–	2,23	–	6,56	–	7,04	–	20,10
24 W	2,20	2,19	6,78	6,70	7,31	7,05	21,36	24,72
52W	2,25	2,25	6,63	6,70	7,33	7,01	21,77	23,05
Zuckerester L 595								
Herstellung	0,28	0,28	0,49	0,49	1,48	1,45	5,42	5,52
4 W	–	0,28	–	0,51	–	PT	–	PT
8 W	–	0,28	–	0,51	–	–	–	–
12 W	–	0,28	–	0,50	–	–	–	–
24 W	PT	0,28	PT	0,50	1,46	–	5,75	–
52W	–	0,28	–	0,49	1,45	–	5,70	–
Zuckerester M 1695								
Herstellung	0,23	0,24	0,50	0,50	0,92	0,96	2,73	2,74
4 W	–	0,24	–	0,50	–	0,95	–	2,71
8 W	–	0,23	–	0,49	–	0,96	–	2,73
12 W	–	0,23	–	0,50	–	0,94	–	2,75
24 W	0,23	0,23	0,49	0,49	0,95	PW	2,88	PW
52W	0,23	0,23	0,50	0,49	0,94	–	2,71	–
Zuckerester O 170								
Herstellung	0,83	0,83	2,41	2,42	5,02	5,00	10,61	10,91
4 W	–	0,84	–	2,54	–	PT	–	PT
8 W	–	1,26	–	7,74	–	–	–	–
12 W	–	PT	–	PT	–	–	–	–
24 W	0,97	–	5,30	–	PT	–	PT	–
52W	PT	–	PT	–	–	–	–	–

Fortsetzung Tab. A1-1

	M10				M500			
	D50 [µm]		D99 [µm]		D50 [µm]		D99 [µm]	
	vA	nA	vA	nA	vA	nA	vA	nA
Zuckerester O 1570								
Herstellung	0,25	3,41	5,73	185,6	1,08	4,52	6,01	89,97
4 W	0,28	3,03	0,54	152,9	–	–	–	–
8 W	–	5,95	–	183,1	–	–	–	–
12 W	–	–	–	–	–	–	–	–
24 W	0,33	2,05	0,58	98,99	1,08	4,12	5,98	129,5
52W	PT	PT	PT	PT	5,46	PT	12,62	PT
Zuckerester S 570								
Herstellung	0,26	0,26	0,48	0,47	0,66	0,65	2,15	2,11
4 W	–	0,25	–	0,46	–	0,66	–	2,14
8 W	–	0,26	–	0,48	–	0,64	–	2,13
12 W	–	0,26	–	0,48	–	0,64	–	2,13
24 W	0,25	0,26	0,45	0,47	0,65	PW	2,12	PW
52W	PW	0,25	PW	0,47	0,62	–	2,19	–
Zuckerester S 1570								
Herstellung	0,27	0,27	0,53	0,52	1,31	1,29	4,80	5,88
4 W	–	0,26	–	0,50	–	1,34	–	5,92
8 W	–	0,26	–	0,51	–	1,89	–	74,86
12 W	–	0,27	–	0,54	–	1,65	–	123,5
24 W	0,27	0,26	0,53	0,53	1,43	1,79	7,22	76,86
52W	PW	0,26	PW	0,54	1,33	1,56	6,19	183,1
HPMC 60SH-50								
Herstellung	1,34	6,80	8,79	21,48	2,99	3,03	7,42	7,34
4 W	–	6,91	–	21,12	–	3,15	–	7,56
8 W	–	6,67	–	21,54	–	3,14	–	7,42
12 W	–	6,72	–	22,99	–	3,05	–	7,41
24 W	1,34	6,65	8,86	21,61	2,92	2,99	7,44	7,34
52W	1,33	6,75	8,79	21,65	–	3,14	–	7,65
HPMC 90SH-100								
Herstellung	2,16	2,12	9,47	8,46	2,67	2,70	6,80	6,89
4 W	–	2,11	–	8,58	–	2,68	–	6,66
8 W	–	2,11	–	8,41	–	2,71	–	6,88
12 W	–	2,05	–	8,59	–	2,68	–	6,82
24 W	2,09	2,01	9,36	8,52	2,72	2,66	6,66	6,72
52 W	2,14	1,94	9,54	8,48	2,72	2,67	6,68	6,63

A2 Zusammensetzung der kommerziellen Emulsionen

Tab. A2-1: : Zusammensetzung der kommerziellen Emulsionen (266,315-318) (* Simeticon → falls Verhältnis von Dimeticon:SiO₂ nicht angegeben; mit 97:3 angenommen)

	Elugan® Tropfen Asche Chiesi GmbH	Espumisan® Emulsion Berlin Chemie AG	Lefax® Pump-Liquid Bayer Vital GmbH	Sab Simplex® Pfizer Pharma GmbH	Silfar® SE4 Wacker Chemie GmbH
Wirkstoffgehalt	41,2 mg Simeticon/ml (97:3) 40 mg Dimeticon/ml <u>4 % (m/v) Dimeticon</u>	40 mg Simeticon/ml = 38,8 mg Dimeticon/ml* <u>3,9 % (m/v) Dimeticon*</u>	41,2 mg Simeticon/ml = 40 mg Dimeticon/ml* <u>4 % (m/v) Dimeticon*</u>	69,19 mg Simeticon/ml (92,5:7,5) = 64 mg Dimeticon/ml <u>6,9 % (m/v) Dimeticon</u>	30 % (m/m) Simeticon <u>29,1 % (m/m) Dimeticon*</u>
Emulgator/ Quasiemulgator	Poly(oxyethylen)-25- glyceroltrioleat Aluminium-Magnesium- Silicat Hydroxyethylcellulose	Glycerolmonostearat Macrogolstearat 1500 Hyprolose	Poly(oxyethylen)-25- glyceroltrioleat Aluminium-Magnesium- Silicat Hydroxyethylcellulose	α-Octadecyl-ω- hydroxypoly- (oxyethylen) ₅ Hypromellose Carbomer 974	Methylcellulose Nichtionischer Emulgator
Konservie- rungsmittel	Sorbinsäure Kaliumsorbat	Sorbinsäure	Sorbinsäure Kaliumsorbat	Sorbinsäure Natriumbenzoat	Sorbinsäure
Süßungsmittel/ Geschmacks- korrigenz Puffersysteme	Saccharin-Natrium Natriumcyclamat Bananen-Aroma Wasserfreie Citronensäure	Saccharin-Natrium Natriumcyclamat Bananen-Aroma	Saccharin-Natrium Natriumcyclamat Bananen-Aroma Wasserfreie Citronensäure	Saccharin-Natrium Natriumcyclamat Himbeer Aroma Vanille Aroma Citronensäure- Monohydrat Wasserfreies Natriumcitrat	
Weitere Bestandteile	Macrogol 6000 Gereinigtes Wasser	Gereinigtes Wasser	Macrogol 6000 Gereinigtes Wasser	Gereinigtes Wasser	Gereinigtes Wasser

A3 Untersuchungen zum Ausbreitungsverhalten - Partikelgröße der Emulsionen

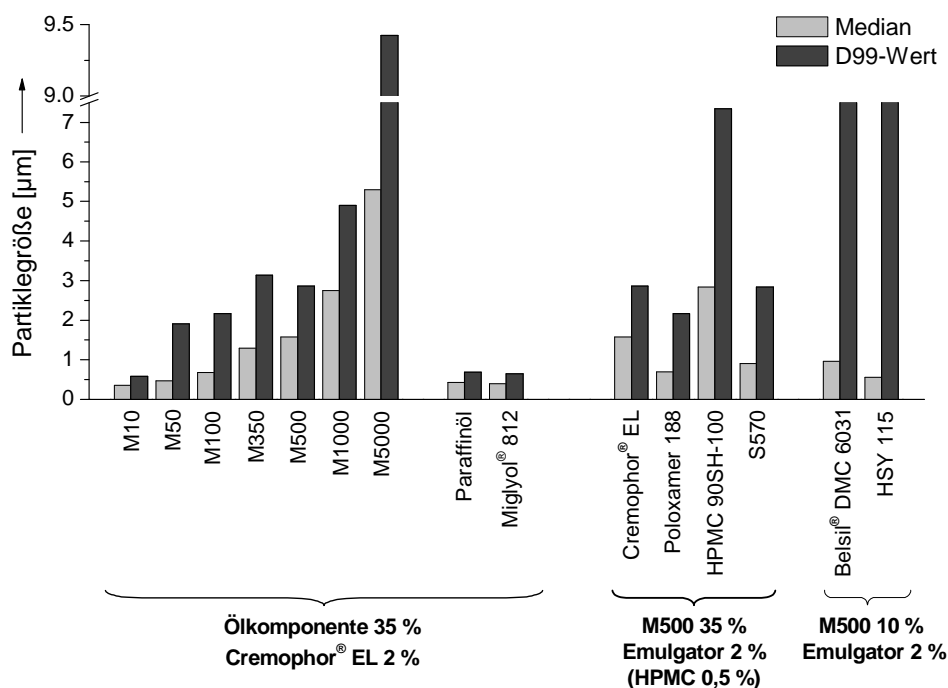


Abb. A3-1: Median und D99-Wert der Emulsionen, die hinsichtlich ihres Ausbreitungsverhalten untersucht wurden (Zusammensetzung: Ölkomponeute 35 % bzw. 10 %; Emulgator 2 % bzw. 0,5 %; Wasser ad 100 % (m/m))

A4 Ergänzende mikrobiologische Untersuchungen mit *S. aureus* und *P. aeruginosa*

Ergänzend zu der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ wurden weitere Untersuchungen mit *S. aureus* und *P. aeruginosa* durchgeführt. In Tab. A4-1 ist die Zusammensetzung der untersuchten Proben dargestellt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 37°C und nicht wie bei der „Prüfung auf ausreichende Konservierung“ bei Raumtemperatur.

Tab. A4-1: Zusammensetzung der Proben, die mit *S. aureus* und *P. aeruginosa* beimpft wurden

Emulsionen					
Ölkomponente		Emulgator		Äußere Phase	
Siliconöl M500	35 %	Cremophor® EL	2 %	Wasser ad 100 %	
		Poloxamer 188	2 %		
Siliconöl M500	35 %	Cremophor® EL	2 %	2,05 % Glycerol in 10mM Phosphatpuffer pH 7,4 ad 100 %	
		Poloxamer 188	2 %		
Sojaöl	35 %	Poloxamer 188	2 %		
Emulgatorlösungen		· 2 % Poloxamer 188 in 2,05 % Glycerol/10mM Phosphatpuffer pH 7,4 · 2 % Cremophor® EL in 2,05 % Glycerol/10mM Phosphatpuffer pH 7,4			
Phosphatpuffer 10 mM		· pH 3,0 und pH 4,0			
Kontrolllösung		· flüssiges Nährmedium (Brain Heart Infusion)			

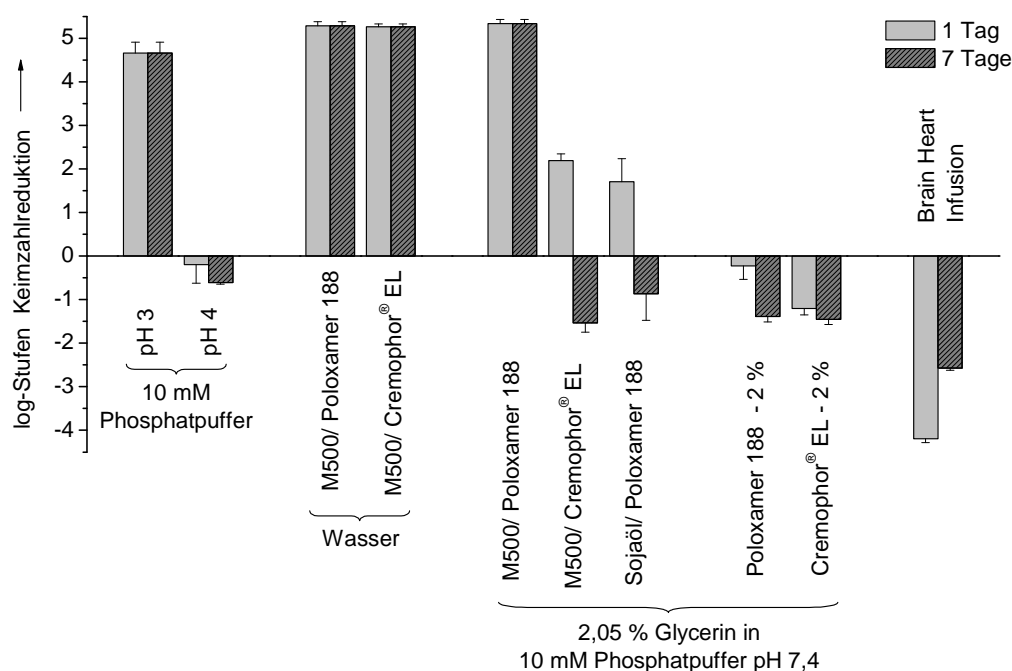
Pseudomonas aeruginosa

Abb. A4-1: Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion von *P. aeruginosa* in den untersuchten Proben nach 1 und 7 Tagen (n=3-4); eine vollständige Keimabtötung in den Proben tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 4,7-5,3 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben)

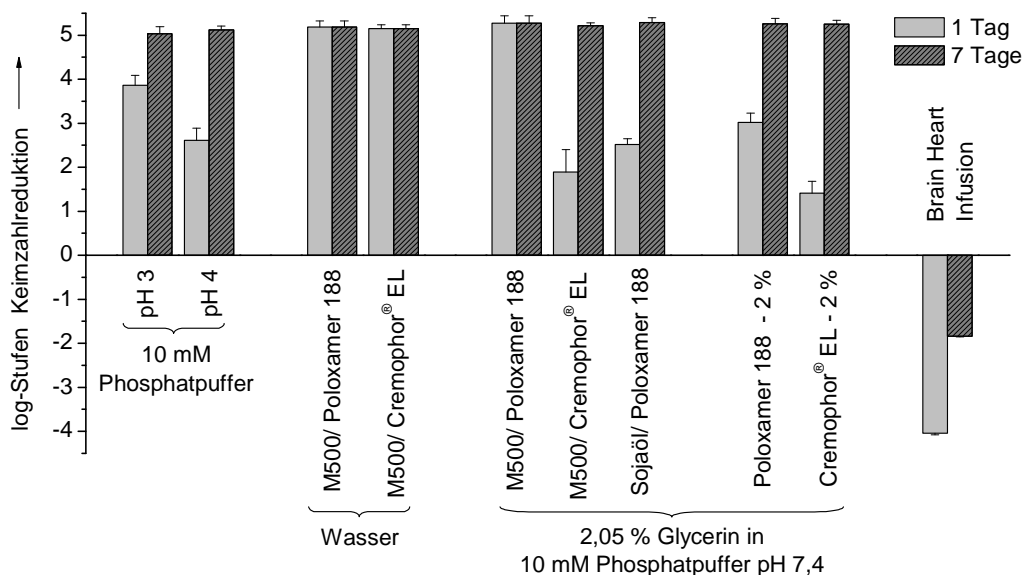
Staphylococcus aureus

Abb. A4-2: Darstellung der logarithmischen Keimzahlreduktion von *S. aureus* in den untersuchten Proben nach 1 und 7 Tagen (n=3-4); eine vollständige Keimabtötung in den Proben tritt bei der Reduktion der Keimzahl um ca. 5,0-5,3 log-Stufen auf (abhängig von der bestimmten Startkeimzahl in den Proben)

A5 Untersuchungen mit *E. coli* 2332 – Median-Werte der Emulsionen

Tab. A5-1: Median-Werte der in Kapitel 4.4.2.2 untersuchten Emulsionen (n=1, 2, 3 oder 5); Bestimmung der Teilchengröße mittels Laserdiffraktometrie nach dem Autoklavieren der Emulsionen (* Proben wurden nicht autoklaviert); *links:* Variation des Emulgators; Formulierung einer M500-Emulsion mit verschiedenen Emulgatoren; *rechts:* Variation der Ölkomponente; Formulierung verschiedener Öle mit 2 % Poloxamer 188 (äußere Phase: 2,05 % Glycerol in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4)

Emulgator	D50 [μm]	Ölkomponente	D50 [μm]
Belsil® DMC 6031	$3,24 \pm 0,12^*$	M10	$0,34 \pm 0,01$
Cremophor® EL	$1,67 \pm 0,11$	M500	$0,78 \pm 0,06$
HLB 8,5	$2,73 \pm 0,57$	M5000	$3,58 \pm 0,52$
HPMC 90SH-100	2,50	Miglyol® 812	$1,04 \pm 0,15$
HSY 115	$1,34^*$	Paraffinum perliqu.	0,38
Poloxamer 188	$0,78 \pm 0,06$	Sojaöl	$0,36 \pm 0,01$
Tween® 80	$2,10 \pm 0,89$		

A6 DSS-induzierte Colitis im Mausmodell – Versuch 3

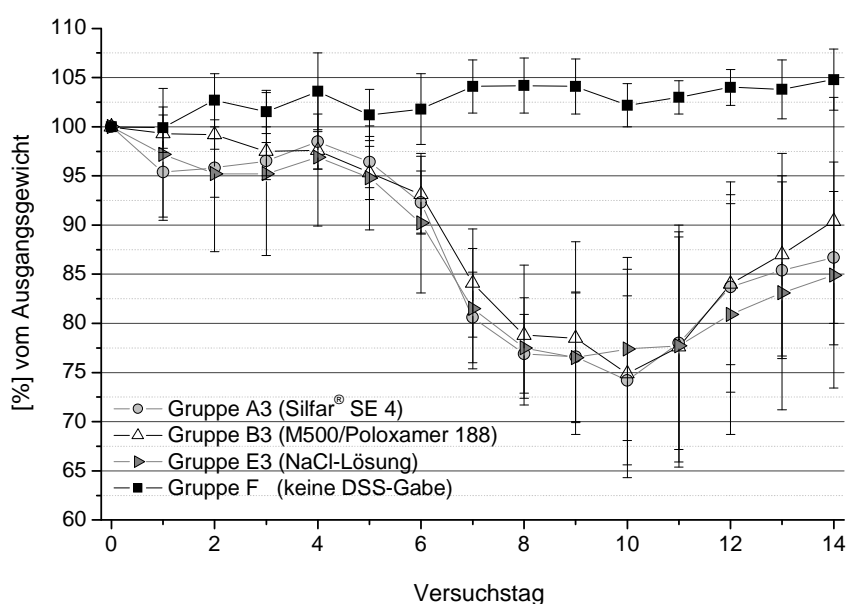


Abb. A6-1: Versuch 3 – Darstellung der Gewichtsverluste der Mäuse über den Versuchszeitraum von 14 Tagen. Zusatz von 2 % DSS zum Trinkwasser bis zum 6. Versuchstag; Start der Therapie parallel zur DSS-Gabe; Applikation der Emulsionen und Lösung via Magenschlauch (0,3 ml/Tag); Anzahl der Tiere pro Gruppe n=10 (Gruppe F: n=6)

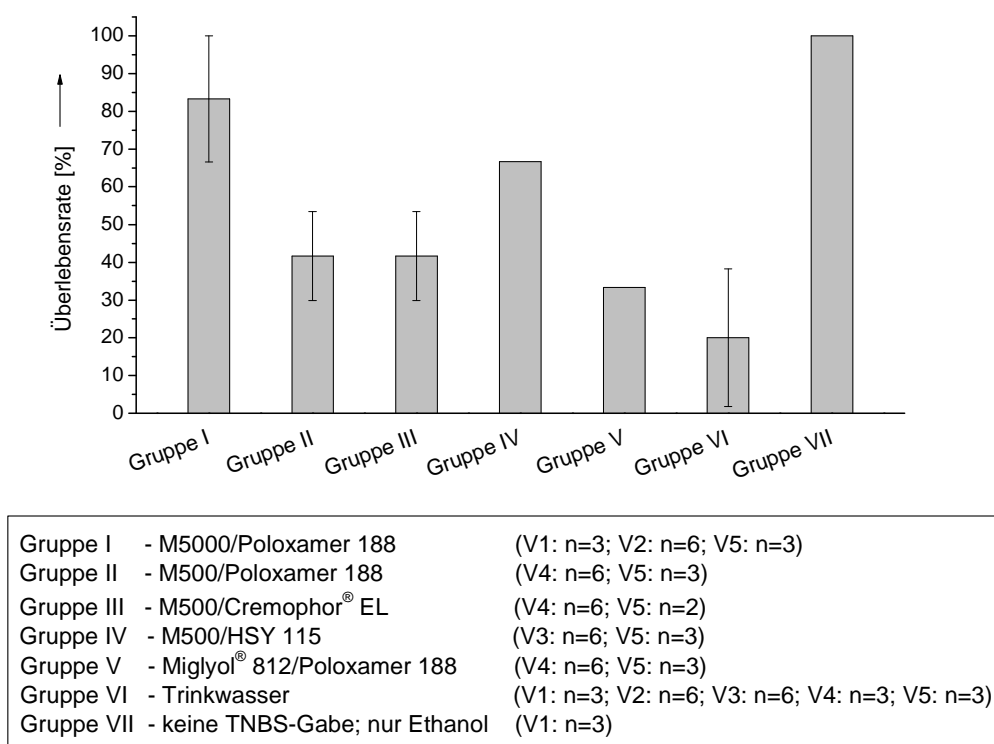
A7 TNBS-induzierte Colitis im Mausmodell – Versuch 1

Abb. A7-1: Darstellung der gemittelten Überlebensraten der Einzelversuche von den Versuchsgruppen I-VII (n=Anzahl der Tiere) nach TNBS-induzierter Colitis am Versuchstag 6 (mit Angabe der Standardabweichung); Gruppe I-V: Therapie der Mäuse mittels verschiedener Emulsionen, die mit dem Trinkwasser ad libitum zur Verfügung standen; Gruppe VI: Gabe von reinem Trinkwasser nach TNBS-Applikation; Gruppe VII: keine TNBS-Applikation;

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Götz Nowak bedanken für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas und das Ermöglichen einer weitgehend selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit. Auch die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche, die zahlreichen Diskussionen und sein Verständnis in der Endphase der Promotion haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Heike Bunjes für die intensive Betreuung meiner Promotion, die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen sowie für die Unterstützung bei der Präsentation ausgewählter Ergebnisse auf verschiedenen Tagungen.

Herrn Prof. Dr. Alfred Fahr danke ich für die Arbeitsmöglichkeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der FSU Jena über den gesamten Zeitraum meiner Promotion. Für die freundliche Unterstützung bei allen technischen Problemen möchte ich mich bei Alexander Mohn bedanken. Auch bei Silvia Petersen möchte ich für die angenehme Zeit, u.a. bei verschiedenen Tagungen, bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Institut für Medizinische Mikrobiologie, FSU Jena, für die Möglichkeit der Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen. Insbesondere möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Nährbodenküche, Herrn Rost und Frau Schade, bedanken.

Für die Kooperationsbereitschaft danke ich auch den Mitarbeitern des Instituts für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. Heiligenstadt, insbesondere Frau Dr. Marion Frant und Holger Rothe.

Prof. Dr. Jürgen Popp möchte ich für die Möglichkeit danken, Raman-mikroskopische Studien an der FSU Jena und CARS-mikroskopische Studien am IPHT durchführen zu lassen.

Ebenfalls danken möchte ich meinen ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe „Pharmakologische Hämostaseologie“, Silvia Heyer, Ines Neubauer, Anne Köhler, Anette Wiesenburg und Dr. Michael Zieger, für die angenehme Zeit in einer freundschaftlichen Atmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dabei Ines Neubauer für die Unterstützung bei allen bürokratischen Problemen und die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Jana Hofmann, Ines Neubauer und meinem Mann Dr. Martin Presselt danke ich sehr für das gründliche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die schöne Kindheit und ihre stetige und liebevolle Unterstützung auf meinem Lebensweg, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Auch meiner Schwester Jana und ihrer Familie möchte ich danken für die gemeinsame Zeit.

Meinen Mann Martin möchte ich danken für die vielen motivierenden Worte, seine Geduld und sein unerschütterlicher Glauben an das Gelingen dieser Arbeit. Außerdem möchte ich ihm und unserem Sohn Friedrich für die vielen schönen Momente abseits des Labor- und Büroalltags danken.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 10.05.2010

Katja Presselt

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katja Presselt, geb. Eichelroth
Anschrift	Dornburger Str. 32 07743 Jena
Geburtsdatum/ -ort	16.04.1981 in Arnstadt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet mit Dr. Martin Presselt 1 Kind - Friedrich Presselt, geb. am 26.07.2009

Schulausbildung

1987-1991	Louis-Fürnberg Oberschule Gräfenroda
1991-1996	Neideck-Gymnasium Arnstadt, Schulteil Gräfenroda
1997-1999	Neideck-Gymnasium Arnstadt, Abitur

Studium

10/1999-10/2003	Studium an der FSU-Jena im Fach Pharmazie
11/2003-04/2004	Pharmaziepraktikantin - Columbus Apotheke Jena
05/2004-10/2004	Pharmaziepraktikantin - Institut für Spitalpharmazie Basel/Schweiz
12/2004	Approbation als Apothekerin

Praktika

03/2000	Famulatur - Lindenberg Apotheke Ilmenau
09/2000	Famulatur - Osswaldsche Apotheke Arnstadt (Versorgungsapotheke des Kreiskrankenhauses Arnstadt)

Tätigkeiten

01/2005-09/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Pharmakologische Hämostaseologie, Universitätsklinikum Jena Anfertigung einer Dissertation: „Herstellung und Charakterisierung von Siliconölemulsionen sowie Untersuchungen zu ihrem therapeutischen Potenzial bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“
seit Juli 2009	Elternzeit

Tagungsbeiträge

- 2006 Jena CRS German Chapter Annual Meeting
Poster (K. Eichelroth, G. Nowak, H. Bunjes): „Preparation and Characterization of Silicone Oil Emulsions for Pharmaceutical Applications”
- 2007 Freiburg CRS German Chapter Annual Meeting
Poster (K. Eichelroth, G. Nowak, H. Bunjes): „Evaluation of the Antimicrobial Activity of Silicone Oil Emulsions”
- 2008 Braunschweig CRS German Chapter Annual Meeting
Poster (K. Eichelroth, G. Nowak, H. Bunjes): „Influence of Different Parameters on the Antimicrobial Activity of Silicone Oil Emulsions”
- 2008 Heiligenstadt 14. Heiligenstädter Kolloquium
Vortrag (K. Presselt, M. Frant, H. Bunjes, G. Nowak): „Untersuchungen zur Oberflächenspannung und zum Benetzungsverhalten von Siliconölemulsionen“
Veröffentlichung im Tagungsband „Technische Systeme für die Lebenswissenschaften“, ISBN 978-3-00-025695-0, S.107-115
- 2008 Bonn DPhG Jahrestagung
Vortrag (K. Presselt, G. Nowak, H. Bunjes): „Einfluss der Viskosität der wässrigen Phase auf die Partikelgröße von Siliconölemulsionen und Lipidnanopartikeln“
- 2009 Halle CRS German Chapter Annual Meeting
Poster (K. Presselt, G. Nowak, H. Bunjes): „Treatment of Experimentally Induced Colitis with Silicone Oil Emulsions”

Jena, den 10.05.2010

